

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

COMITÉ DE RÉDACTION

- D^r CALMETTE**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r CHANTEMESSE, professeur à la Faculté de Médecine ;
D^r LAVERAN, membre de l'Institut de France ;
D^r L. MARTIN, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r ROUX, directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r VAILLARD, membre de l'Académie de Médecine.

TOME TRENTE-TROISIÈME

1919

AVEC 11 PLANCHES

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

QR
1
A475
V.33
1919
PER

Digitized by the Internet Archive
in 2024

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de É. Metchnikoff.

ÉTUDE SUR LE POUVOIR ANTITRYPTIQUE DU SÉRUM SANGUIN

I. — SES VALEURS LIMITES; LEUR EXPRESSION NUMÉRIQUE

II. — LE MOUVEMENT DE LA PROTÉOLYSE
DANS UN MILIEU « GÉLATINE-TRYPSINE-SÉRUM »

par L. LAUNOY.

(Avec les planches I-IV.)

Les procédés les plus couramment employés jusqu'ici pour l'évaluation de l'action antitryptique du sérum sanguin ont été ceux de Marcus et de Gross-Fuld.

Dans la méthode de Marcus comme dans celle de Gross-Fuld, on estime le pouvoir antitryptique — désigné comme « indice antitryptique » — par la concentration de trypsine susceptible d'hydrolyser en présence d'une quantité arbitraire de sérum choisie comme unité, soit un volume donné de solution de caséinate de soude (Gross-Fuld), soit du sérum coagulé (Marcus).

Les critiques principales s'adressant à ces techniques sont les suivantes :

1° On prend comme unité le sérum à examiner, c'est-à-dire, à proprement parler, l'inconnue du problème ;

2° Dans la méthode de Marcus, on se contente de donner le

titre de la macération de trypsine employée, sans en déterminer la puissance diastasique ;

3° Dans l'établissement de ce qu'on a appelé l'« *indice anti-tryptique* », on méconnaît les lois d'action des diastases.

Quand on dit, par exemple, que les indices antitryptiques de deux sérums sont respectivement 1 : 4 et 1 : 8, cela veut dire qu'une goutte du premier sérum inhibe quatre gouttes de la macération de trypsine, une goutte du second sérum inhibe huit gouttes de la même solution. On semble sous-entendre par cette notation que l'action antidiastasique du second sérum est deux fois plus grande que celle du premier, ce qui n'est pas exact. On sait que :

a) L'effet utile produit par la trypsine dans un temps déterminé n'est pas directement proportionnel à la masse du ferment ;

b) Il n'y a pas non plus de proportionnalité directe entre l'action antagoniste d'un sérum et la masse de ce sérum (voir les graphiques, planches I à IV) ;

4° Les données numériques que l'on tire des méthodes de Marcus ou de Gross-Fuld ont une signification conventionnelle, mais elles n'ont aucune signification objective ; ceci est le corollaire des 3 observations précédentes.

En employant l'action présurante de la trypsine, Achalme et Stévenin ont inauguré une méthode qui est à l'abri des objections ci-dessus. Ils prennent la trypsine comme unité ; ils titrent leur solution tryptique ; ils notent leurs résultats d'après la quantité de sérum actif. Ainsi, les auteurs français ont réalisé une méthode raisonnée pour l'évaluation de l'action antidiastasique du sérum sanguin. Il semblerait que la question est close, au moins du point de vue technique. Cela ne me paraît pas.

En effet, tout en reconnaissant que les actions présurante et hydrolytique de la pepsine et de la trypsine sont habituellement parallèles et difficiles à séparer, on ne peut néanmoins considérer l'action anti-lab comme une action hydrolytique, à proprement parler. D'autre part, il est difficile d'admettre le titrage du ferment par rapport à l'antiferment, et non pas par rapport au test.

A elles seules, ces raisons étaient suffisantes pour m'inciter à rechercher une technique, permettant de reprendre, sur des bases sûres, certains points de l'action antiprotéolytique des sérums sanguins.

I

VALEURS LIMITES DU POUVOIR ANTITRYPTIQUE LEUR EXPRESSION NUMÉRIQUE

L'application de toute technique comporte : 1° la préparation des réactifs ; 2° l'établissement de la réaction ; 3° l'estimation des phénomènes ; 4° l'expression numérique de ceux-ci.

Dans l'étude des réactions humorales, la technique est de première importance, tout ce qui concerne son application doit donc être minutieusement suivi.

1° PRÉPARATION DES RÉACTIFS

A. — **Test d'épreuve.** J'ai choisi, pour test d'épreuve, la gélatine. La grande sensibilité de cette substance aux actions tryptiques l'a fait rejeter par quelques chercheurs. Je crois, au contraire, cette sensibilité favorable à l'étude des phénomènes antidiastasiques. Un argument plus important contre son emploi consiste dans son impureté. Mais la purification par dialyse rétorque cet argument.

DIALYSE. — On part d'une gélatine commerciale aussi pure que possible (marques : médaille d'or; extra). La purification sera faite de la façon suivante :

50 grammes de gélatine en feuilles sont plongés tels quels dans un bocal à large ouverture, rempli d'eau distillée neutralisée à la phénolphthaléine comme indicateur; on met 1 gramme de gélatine pour 70 grammes d'eau.

La dialyse est faite à la glacière (5°-10°). L'eau est renouvelée toutes les 24 heures, pendant 7 jours. On peut diminuer ce temps de 24 ou 48 heures, en changeant l'eau deux fois par jour, pendant les 2 premiers jours, mais la dialyse de 7 jours sera préférée.

On considère comme débarrassée de ses impuretés « dialysables » la gélatine dont l'eau de dialyse n'est plus acide, ne donne plus trace de précipité avec le chlorure de baryum, l'oxalate d'ammonium, le nitrate d'argent, l'acide picrique. On se prononce après plusieurs heures de contact entre le réactif et l'eau de dialyse. C'est avec l'acide picrique (solution aqueuse saturée) que l'eau de dialyse réagit le plus longtemps.

Évidemment, si la purification n'est pas obtenue en 7 jours, on continue; plus la dialyse se prolonge, plus on doit veiller à la température de la glacière.

On sait que la gélatine est très acide; par dialyse, elle perd une grande partie de cette acidité, mais elle reste néanmoins acide.

Voici, pour 50 grammes de gélatine Coignet extra, un exemple de la perte d'acidité au cours de la dialyse :

Dosée sur 5 grammes, l'acidité avant dialyse était de 8 c. c. 5 de soude normale pour 50 grammes.

Au cours de la dialyse de 50 grammes de cette gélatine :

1 ^{er} jour,	l'eau de dialyse est ramenée à la neutralité avec :	3 c. c. 6	NaOH/N
2 ^e jour,		0 c. c. 6	NaOH/N
3 ^e jour,		0 c. c. 45	NaOH/N
4 ^e jour,		0 c. c. 3	NaOH/N
5 ^e jour,		0 c. c. 3	NaOH/N
6 ^e jour,		0	NaOH/N

soit un départ d'acidité équivalant à 5 c. c. 25 de solution normale de soude. Dans cet exemple, il a fallu, après dialyse, 3 c. c. 3 de soude normale pour neutraliser l'acidité intrinsèque de 50 grammes de gélatine.

La gélatine étant dialysée, on la fait fondre au bain-marié, *dans son eau d'imbibition*. Au cours de la dialyse prolongée, la gélatine absorbe d'une façon régulière de 9,5 à 10 fois son poids d'eau. Voici des exemples :

1 ^o	{ Avant dialyse	50 gr.	
	{ Après dialyse de 70 heures		487 gr.
2 ^o	{ Avant dialyse	50 gr.	
	{ Après dialyse de 7 jours		500 gr.
3 ^o	{ Avant dialyse	50 gr.	
	{ Après dialyse de 9 jours		517 gr.

Par addition d'eau ou légère évaporation à basse température, on ramène la solution de gélatine au taux de 10 p. 100.

La solution obtenue d'emblée est très louche, opaque ; on l'additionne de 15 cent. cubes de teinture de tournesol *dialysée* sensibilisée, puis la neutralisation est faite de telle façon que la gélatine *reste nettement acide à la phénolphthaléine* ; *cette acidité à la phénolphthaléine doit être neutralisée par 0 c.c. 15 de solution N/10 de soude pour 5 cent. cubes de solution de gélatine à 10 p. 100.*

L'addition d'alcali à la gélatine fondue a pour effet immédiat d'éclaircir la solution. On filtre sur papier Chardin, à 45°, en évitant l'évaporation.

On répartit ensuite dans des fioles de 60 cent. cubes, bouchées au coton ; le tampon de coton est lui-même recouvert d'un capuchon de plusieurs doubles de papier filtre ordinaire.

On stérilise à 105° pendant 10 minutes ; on conserve à la glacière.

Pour l'usage, on répartit au moment du besoin dans des tubes à essai, 2 cent. cubes de cette gélatine fondue à 45°.

UNITÉ DE TEST: — *Notre test d'épreuve est donc constitué par 2 cent. cubes de gélatine (mesurés à 45°) d'une solution à 10 p. 100 de gélatine dialysée, neutre au tournesol, acide à la phénolphthaléine dans les limites de 0 c.c. 05, 0 c.c. 07 de soude pour 2 cent. cubes. Au sortir de l'étuve (41°) ce test se gélifie en : 1 à 2 minutes à 10°, en 4 à 5 minutes à 20°.*

B. — Solution tryptique. Toute trypsine dont une macération à 0 gr. 50 p. 100 dans l'eau distillée ou bien l'eau physiologique pendant 24 heures à la glacière n'est pas très active, doit être rejetée.

Il faut, en effet, éviter l'introduction en grande quantité dans la solution de substances solubles étrangères comme cela arrive avec les trypsines commerciales faiblement actives.

Un essai préliminaire ayant renseigné sur la valeur du ferment, on prépare comme suit la solution tryptique.

On fait macérer 0 gr. 50 de *trypsine* (il ne faut pas employer les pancréatines commerciales) dans 100 cent. cubes d'eau distillée ou d'eau physiologique (selon la trypsine l'un ou l'autre solvant sera employé) pendant 24 heures à la glacière ; on agite la macération de temps à autre pendant cette période.

Après 24 heures, on filtre sur papier, puis sur bougie. La solution-mère (solution M) ainsi obtenue est répartie dans des tubes à raison de 5 à 10 cent. cubes par tube; les tubes sont fermés à la flamme, on les conserve dans la caisse à glace. Dans ces conditions de préparation et de conservation l'activité d'une bonne trypsine se maintient intacte pendant plusieurs mois.

L'opération la plus importante réside dans le *titrage de la solution de trypsine*.

Pour titrer la solution qui sera l'unité tryptique, on établit avec de l'eau physiologique les dilutions suivantes de la solution-mère :

Dilutions : $\frac{M}{2}$, $\frac{M}{3}$, $\frac{M}{4}$, $\frac{M}{5}$, $\frac{M}{10}$ et les dilutions intermédiaires $\frac{M}{2,5}$, etc., s'il y a lieu.

On fait agir 0 c. c. 1 et 0 c. c. 2 de chaque dilution sur l'unité de test additionnée de 0 c. c. 9 et 0 c. c. 8 de solution physiologique; on porte ces essais qui ont été établis en double à l'étuve à 41° pendant 45 et 60 minutes.

La dilution convenable sera celle qui, en une heure à 41°, liquéfie l'unité de test et ne la liquéfie pas totalement en 45 minutes.

La dilution ainsi arrêtée qualitativement, on fait agir l'unité convenable, 0 c. c. 1 ou 0 c. c. 2 selon le cas, sur le test d'épreuve pendant 18 heures à 41°. Dans ces conditions, l'acidité totale acquise par le milieu en digestion doit être neutralisée par 1 c. c. 2-1 c. c. 3 de solution N/10 de soude.

UNITÉ TRYPTIQUE. — *L'unité tryptique est donc définie par 0 c. c. 1 (ou 0 c. c. 2) d'une solution de trypsine liquéfiant à 41° en 1 heure d'action, l'unité de test. Agissant sur l'unité de test, elle détermine en 18 heures à 41° une acidité totale acquise neutralisée par 1 c. c. 2-1 c. c. 3 de soude N/10.*

2° ÉTABLISSEMENT DE LA RÉACTION

Elle comporte trois réactifs : l'unité de test, l'unité tryptique, le sérum.

Nous connaissons les deux premiers. Le sérum sera, sauf

exception (sérum d'anguille), le sérum de caillot exsudé à la température ordinaire (20°). Tout sérum coloré, même peu, par l'hémoglobine, ne sera pas employé. Pour établir la réaction, on opère comme suit :

1° Verser dans des tubes à essai, stérilisés après lavage soigneux, des volumes de sérum compris entre 0 c.c. 0005 jusqu'à 0 c.c. 3 et 0 c.c. 4. Pour les doses entre 0 c.c. 0005 et 0 c.c. 1, on se sert de dilutions à 1/100 et 1/10 ; pour les doses situées entre 0 c.c. 1 et 0 c.c. 2, on combine le sérum pur et la solution au 1/10, de même pour les doses supérieures à 0 c.c. 2 et 0 c.c. 3, etc...

Les dilutions de sérum sont faites avec l'eau physiologique ; pour la répartition on fait usage de longues pipettes divisées en dixièmes de centimètres cubes : on choisit les pipettes donnant III gouttes au dixième.

2° Ajouter sur le sérum, l'unité tryptique, soit : 0 c.c. 1 ou 0 c.c. 2 ;

3° Parfaire dans chaque tube avec de l'eau physiologique le volume de 1 cent. cube ;

4° Laisser en contact 60 minutes, à la température du laboratoire (20°-25°) ;

5° Verser sur le mélange sérum-trypsine 2 cent. cubes de gélatine test mesurés à 45° ;

6° Mélanger soigneusement ;

7° Porter à l'étuve à 41° ; laisser 18 heures.

Toutes ces opérations doivent être faites aseptiquement. Il est donc nécessaire de préparer d'avance un copieux matériel de pipettes de 10 cent. cubes, 2 cent. cubes et 1 cent. cube stérilisées, ainsi que des tubes à essai et de l'eau physiologique stériles.

Tubes témoins. — Chaque expérience doit être accompagnée de tubes témoins. Les tubes témoins comprennent :

1° *Témoin trypsine*, c'est-à-dire : unité tryptique + eau salée + gélatine ;

2° *Témoins sérum.* — Je fais des témoins sérum contenant selon l'expérience, 0 c.c. 05, 0 c.c. 1, 0 c.c. 15, 0 c.c. 2, 0 c.c. 25, 0 c.c. 3 de sérum + eau salée + gélatine.

Les quatre témoins constants et d'importance première sont :

Pour le sérum de Mammifères : Le témoin Trypsine et les trois premiers témoins sérum (0 c.c. 05, 0 c.c. 1, 0 c.c. 15). Il n'est pas inutile d'ajouter un *cinquième tube témoin* contenant : gélatine-test + 1 cent. cube eau salée.

Pour le sérum Humain, on peut se contenter de deux témoins seulement : 0 c.c. 05 et 0 c.c. 1.

3° ESTIMATION DES RÉSULTATS; LEUR EXPRESSION NUMÉRIQUE

Le premier indice de l'attaque de la gélatine par la trypsine se constate par la disparition de la propriété de gélification à froid de cette substance; nous savons que notre unité tryptique obtient ce résultat en une heure à 41°. On considère en général que la liquéfaction de la gélatine ne s'accompagne pas de phénomènes d'hydrolyse proprement dits. Il y aurait un état physique de la gélatine, intermédiaire entre la gélatine intacte et la gélatine dissociée, pour lequel la propriété de gélification de la gélatine pure n'existe plus. En somme, il y aurait une sorte d'état allotropique de la gélatine pure, non dissociée, pour lequel la propriété importante de gélification n'est pas constatée. *Cohnheim* et *Mann* avec lui acceptent cette explication. Elle ne me paraît pas admissible. Une gélatine encore capable de se gélifier après action de la trypsine est déjà de neutre devenue acide; cette acidification, plus tard, s'accroît; à partir d'un certain taux d'acidité, variable avec la concentration de la solution, la gélatine ne se gélifie plus par refroidissement. Ce caractère nouvellement acquis : acidité du milieu, acidité faible il est vrai, mais certaine, indique une hydrolyse (voir le tableau : Etablissement du graphique pour le sérum de cobaye).

Tant que les actions hydrolytiques déterminées par la trypsine sont peu marquées, le caractère du « gel » persiste; il disparaît pour une digestion plus longue ou plus intense.

Le résultat *minimum* de l'action antidiastatique d'un sérum est donc d'apporter un retard dans l'action de l'unité tryptique s'exerçant pendant l'unité de temps. Ainsi en présence du sérum et de l'unité tryptique la gélatine doit, après 1 heure à 41°, conserver sa propriété de gélification.

Le résultat *maximum* de l'action antidiastatique sera de

conserver cette propriété de gélification pendant une digestion prolongée.

La valeur de l'action antitryptique d'un sérum se définit donc par deux termes au moins. Le premier terme mesure l'action *retardatrice*, le second mesure l'action *inhibitrice* ou apparemment telle; nous verrons qu'il n'y a pas, sur la gélatine, d'inhibition absolue du ferment tryptique par un sérum sanguin.

Pour évaluer le pouvoir retardateur et inhibiteur du sérum essayé, en faisant intervenir la propriété de gélification à froid de la gélatine, on procède comme suit :

A) Après une heure de séjour à 44°, les essais comportant des quantités de sérum égales ou inférieures à 0 c. c. 01 sont retirés de l'étuve et plongés dans un bain d'eau refroidie à 10°.

Après 15 minutes, on note le premier tube présentant le phénomène de gélification.

Exemple : Si, dans l'ordre des essais, le premier tube se gélifiant est l'essai qui contient 0 c. c. 002 de sérum, ce volume de sérum marquera le premier terme du pouvoir antiferment; *il représente objectivement la plus petite quantité de sérum capable de retarder l'action de la trypsine, pendant la première heure de digestion, il mesure en un mot le « seuil » de l'action inhibitrice.*

B) Le second terme, c'est-à dire la valeur supérieure limite que nous pouvons appeler l'« *optimum* », sera fourni par la plus petite quantité de sérum capable d'inhiber l'action de la trypsine pendant le temps maximum d'action de ce le-ci.

Ce second terme est évalué de la façon suivante : après 18 heures d'étuve, on retire les tubes et on les plonge immédiatement dans un bain d'eau, à 20°. La gélification d'un tube témoin sans trypsine, ni sérum, se fait, dans ces conditions, en 3 à 4 minutes. On note le temps de gélification des tubes si on désire obtenir l'*optimum absolu*; en pratique, on notera le premier tube qui présente, après 10 minutes, une gélification parfaite, c'est-à-dire un gel solide, stable, ne se détachant pas du tube quand on frappe celui-ci sur le doigt. L'essai qui répond à ces conditions sera noté comme optimum. En réalité, l'optimum ainsi déterminé n'est que l'« *optimum approché* »; nous verrons plus loin que pour cet optimum, dans la plupart des cas, il s'est produit un commencement de digestion. Cette

valeur, encore qu'elle ne soit que relative, est celle qui caractérise le mieux, en donnée numérique, l'action antitryptique d'un sérum. Nous nous en convaincront mieux quand nous parlerons de l'*optimum réel*.

D'ailleurs, nonobstant ces réserves, le graphique du mouvement de l'action protéolytique de la trypsine sur la gélatine en présence de différents volumes du sérum examiné apporte des documents particulièrement instructifs ; ils permettent de situer (même sans rechercher l'*optimum* par la gélification) les sérums rigoureusement à leur place dans l'échelle de l'activité antitryptique.

En résumé, nous définissons actuellement l'action antitryptique d'un sérum par deux termes : le « *seuil* » et l'« *optimum approché* ».

Le « *SEUIL* », c'est la plus petite quantité de sérum capable de retarder l'action liquéfiante de l'unité tryptique, quand celle-ci s'exerce sur l'unité de test dans l'unité de temps.

L'« *OPTIMUM APPROCHÉ* », c'est la plus petite quantité de sérum qui, en présence de l'unité tryptique et dans des conditions telles que celle-ci épuise normalement son action, conserve à l'unité de test la propriété de se prendre en un gel solide, en 10 minutes, par refroidissement à 20°.

Dans le chapitre suivant, nous apprendrons à faire intervenir, dans notre appréciation sur la valeur antitryptique d'un sérum, un troisième facteur : l'*optimum réel*.

En opérant comme nous l'avons dit ci-dessus, nous avons obtenu, pour les sérums étudiés, les valeurs antitryptiques suivantes :

SÉRUM	SEUIL	OPTIMUM APPROCHÉ
Cobaye.	(0,0005-0,002)	(0,05-0,07)
Homme.	(0,001 -0,002)	(0,04-0,07)
Cheval	(0,001 -0,002)	(0,05-0,07)
Mouton.	0,002	0,06
Chien.	0,002	(0,07-0,08)
Lapin.	(0,002 -0,003)	(0,1 -0,16)
Anguille	0,002	(> 0,1)
Poule.	0,002	(0,3 -0,4)

Dans les expressions numériques ci-dessus, deux nombres entre parenthèse indiquent les variations individuelles trouvées dans une même espèce.

En se servant des données établies ci-dessus, la valeur antitryptique d'un sérum s'exprime ainsi :

Exemple : Valeur antitryptique sérum de Cobaye = (0 c.c. 002 — 0 c.c. 07) dans laquelle 0 c.c. 002 représente en centimètres cubes de sérum la valeur du *seuil* et 0 c.c. 07 la valeur de l'*optimum approché*.

C'est évidemment cette dernière valeur qui est la plus intéressante. Elle permet de mettre sur le même plan, relativement à leur action antitryptique les sérums de *Cobaye, Homme, Cheval, Mouton*; elle est pour ces sérums très généralement égale à 0 c.c. 05.

Le Chien s'éloigne fort légèrement avec 0 c.c. 08 comme moyenne.

Le Lapin présente la variation la plus considérable, l'optimum oscillant entre 0 c.c. 1 et 0 c.c. 16 et même 0 c.c. 2. Il est d'une façon générale voisin de 0 c.c. 1.

La Poule s'éloigne considérablement de ce chiffre avec 0 c.c. 3 0 c.c. 4.

Je signale ici seulement le fait, me proposant d'insister plus tard sur la valeur antitryptique du sérum des Oiseaux et des Poissons (1).

II

LE MOUVEMENT

DE LA PROTÉOLYSE DANS UN MILIEU « GÉLATINE-TRYPSINE » ET DANS UN MILIEU « GÉLATINE-TRYPSINE-SÉRUM SANGUIN »

Les recherches ci-dessus ne nous donnent sur la marche de la protéolyse aucun renseignement. L'étude de celle-ci est pourtant particulièrement intéressante, puisqu'elle permet l'analyse

(1) Quelques-uns des chiffres du tableau ci-dessus diffèrent de ceux que j'ai publiés dans ma note du 17 avril 1918, dans les *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*. Ceci est vrai, en particulier, pour le lapin et l'anguille. Ces différences résultent de ce que je passais d'abord dans la répartition du sérum de la quantité 0 c.c. 1 à 0 c.c. 2, 0 c.c. 3, etc. J'ai depuis observé la nécessité de faire les essais d'une façon plus serrée : 0 c.c. 1, 0 c.c. 12, 0 c.c. 14, etc.

Je dois ajouter également que *plus le ferment est purifié*, plus les réactions de fixation sont violentes. Avec une trypsine très pure j'ai obtenu nombre de cas de sérums d'homme et de cheval ayant 0,04 comme *optimum approché*.

du phénomène dont, par le caractère tiré du « Gel », nous ne connaissons que la fin.

Nous allons voir comment il est possible d'obtenir, par une méthode simple et précise, des détails sur le mouvement de la protéolyse de la gélatine, hydrolysée par la trypsine, en présence ou non de sérum sanguin.

A. — ACIDIFICATION DU MILIEU GÉLATINE-TRYPSINE AU COURS DE LA DIGESTION

De nombreux auteurs ont étudié, avec la gélatine comme test, les lois d'action des diastases. Leur attention, surtout attirée vers les modifications physiques du milieu, ne s'est pas attachée à la réaction des produits de dissociation. Il est juste de dire aussi qu'en employant le suc pancréatique, très alcalin comme on sait, le changement de réaction du milieu peut être masqué : au contraire, quand on opère en milieu neutre (au tournesol ou à la phénolphthaléine), avec une solution tryptique neutre, les phénomènes chimiques sont nettement visibles. On s'aperçoit alors que la digestion tryptique de la gélatine donne rapidement naissance à des produits acides.

L'action de la trypsine s'exerçant sur une gélatine neutre au tournesol et tournesolée, le virage de la teinte bleue à la teinte rose se constate déjà après une heure d'étuve à 41°, même lorsque la quantité de trypsine employée est faible, comme c'est le cas pour nos expériences.

L'acidité progresse rapidement pendant les 4 premières heures de digestion, plus lentement de la 4^e à la 6^e heure. A ce moment, l'acidité acquise est égale à la moitié de ce qu'elle sera à la 24^e heure. Donc, dès la 6^e heure, la vitesse de réaction est considérablement diminuée. Cette diminution n'est que partiellement due à l'acidité libre acquise ; en effet, la neutralisation des produits acides au fur et à mesure de leur formation ne conduit pas la digestion sensiblement plus loin que le terme atteint par elle sans neutralisation. La cause du ralentissement de la digestion tient donc au moins autant à l'affaiblissement du ferment qu'à l'acidité du milieu.

Les faits précédents s'appliquent aussi bien à la gélatine

neutre au tournesol qu'à la gélatine neutre à la phénol-phtaléine; dans ce dernier cas, toutefois, l'acidification est au début plus rapide qu'avec la gélatine neutralisée au tournesol, les résultats deviennent identiques dans les deux cas, dès la 8^e ou 10^e heure.

Nous indiquons dans ce mémoire uniquement les faits principaux qui concernent la digestion de la gélatine par la trypsine. L'étude des produits d'hydrolyse ne rentre pas dans le cadre de ce travail; disons toutefois que l'acidité, qui prend naissance dans la digestion de la gélatine par la trypsine, n'est pas due aux substances étrangères préexistantes. Mes premières recherches avaient été faites avec de la gélatine non dialysée, leur contrôle avec de la gélatine dialysée m'a permis d'observer les mêmes phénomènes. Ainsi, l'acidité acquise, libre, n'est pas due à des acides, sels acides, etc., ayant échappé à la neutralisation, et qui seraient libérés par la digestion. On conçoit d'ailleurs peu la possibilité de ce fait.

L'acidité que présente le milieu trypsine-gélatine au cours de la digestion est donc bien due à l'hydrolyse diastasique de la gélatine.

Nous trouvons dans les recherches de Siegfried, Krüger, Müller, etc., l'explication vraisemblable de ce changement de réaction. Siegfried et ses élèves ont, en effet, isolé de l'hydrolyse de la gélatine, d'une façon générale de l'antigroupe des albuminoïdes, des antipectones à caractère d'acides monobasiques rougissant fortement le tournesol et déplaçant l'acide carbonique de ses sels. Il est possible que notre acidité soit due à des albumoses et peptones à caractère acide (1).

En même temps que la formation de substances acides rougissant le tournesol et donnant directement des combinaisons sodiques, on constate celle d'amino-acides dont l'acidité sera libérée seulement après l'action du formol (procédé de Schiff-Sørensen). Dans un milieu gélatine-trypsine neutre au tournesol, en l'absence de sérum sanguin et pour un volume de 3 cent. cubes de gélatine-test, l'acidité libérable par le formol est

(1) SIEGFRIED, *Zeitsch. f. Physiol. Ch.*, vol. XXXVIII, 1903, p. 258.

MÜLLER, *id.*, vol. XXXVIII, 1903, p. 264.

BORKEL, *id.*, vol. XXXVIII, 1903, p. 268.

KRÜGER, *id.*, vol. XXXVIII, 1903, p. 320.

nettement inférieure à celle des substances acides réagissant sur le tournesol ; mais, contrairement à la formation des substances acides, celle des amino-acides se soutient plus longtemps à la vitesse initiale. Ceci ne s'applique qu'aux petites quantités de trypsine, l'acidité en amino-acides pouvant être, pour une forte proportion de trypsine, non seulement égale, mais supérieure à l'acidité libre, dès le début de la digestion.

Il résulte du fait indiqué ci-dessus que : d'abord divergentes, les courbes représentatives des deux acidités deviennent bientôt parallèles, s'approchent, puis se coupent vers la 30^e heure de digestion.

En résumé, nous pouvons suivre par un simple titrage d'acidité, ou mieux par ce titrage combiné avec la méthode de Sørensen, l'hydrolyse de la gélatine par la trypsine.

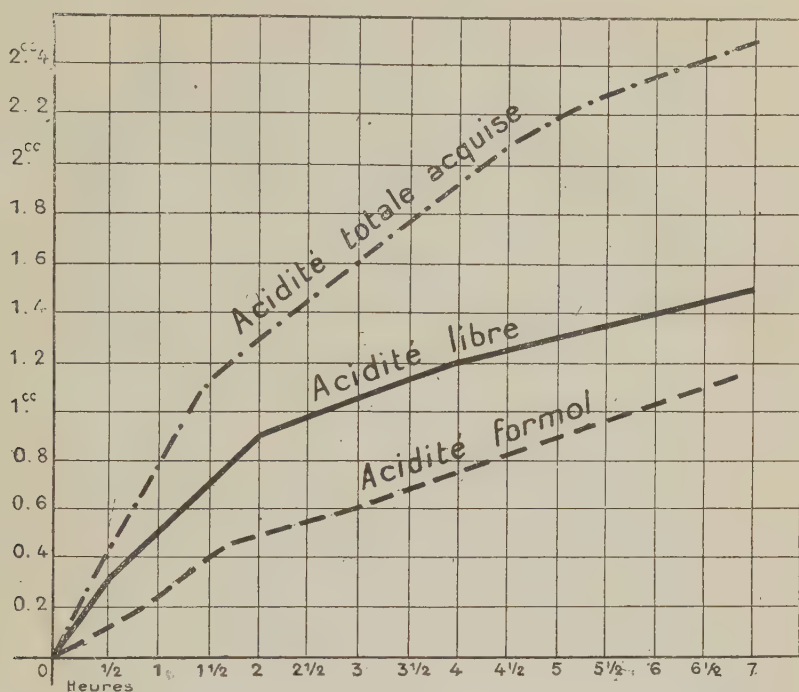
Les faits consignés dans ce chapitre sous forme de conclusions résultent d'expériences dont nous donnons ci-dessous quelques types.

*
* *

EXP. I. — *De l'action de la réaction de milieu sur la vitesse de digestion. Dans cette expérience on fait agir sur 5 cent. cubes de gélatine-test (non dialysée) 1 cent. cube de solution de trypsine diluée de façon suivante : Trypsine-test, 12 cent. cubes; Eau physiologique, 15 cent. cubes.*

1^o Gélatine neutre au tournesol.

ACIDITÉS CALCULÉES en c. c. NaOH N/10 en présence DE PHÉNOLPHTALÉINE	TEMPS DE DIGESTION EN HEURES, A 41°								
	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	6	7
Acidité directement titrable (corrigée) . .	0,3	0,5	0,7	0,9	1	1,2	1,3	1,4	1,5
Acidité titrable après formol (corrigée) . .	0,1	0,2	0,4	0,45	0,6	0,7	0,9	1	1
Acidité totale acquise.	0,4	0,7	1,1	1,35	1,6	1,9	2,2	2,4	2,5



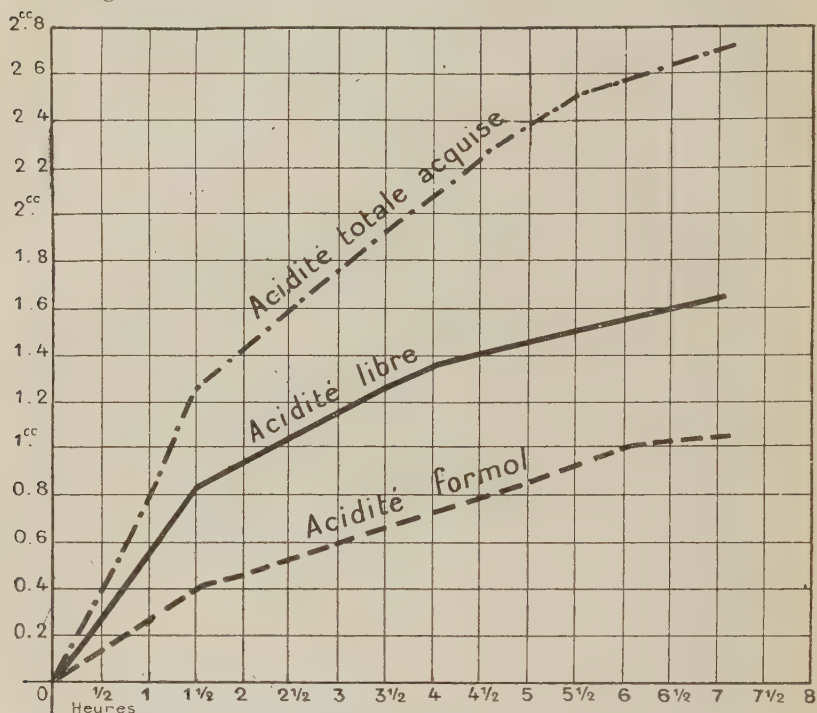
GRAPHIQUE 1. — Correspond au tableau de la page précédente.

2° Gélatine neutre à la phénolphtaléine.

ACIDITÉS CALCULÉES en c. c. NaOH N/10 en présence DE PHÉNOLPHTALÉINE	TEMPS DE DIGESTION EN HEURES, A 41°								
	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	6	7
Acidité directement titrable (corrigée) . .	0,25	0,55	0,85	0,95	1,15	1,35	1,45	1,55	1,65
Acidité titrable après formol (corrigée) . .	0,1	0,2	0,4	0,45	0,6	0,7	0,85	1	1,05
Acidité totale acquise.	0,35	0,75	1,25	1,4	1,75	2,05	2,30	2,55	2,70

Comme il résulte de la lecture de ces tableaux, la réaction neutre à la phénolphtaléine facilite légèrement, ce qui est

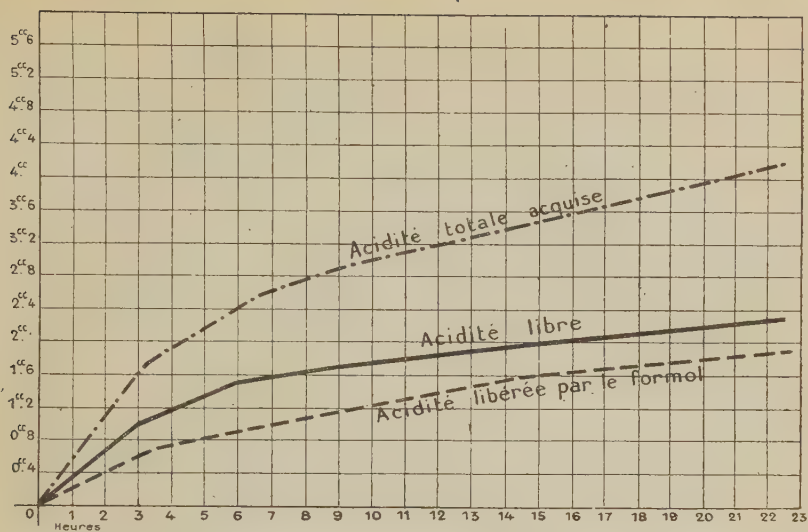
conforme à tout ce que nous savons, la réaction de la trypsine sur la gélatine.



GRAPHIQUE 2. — Correspond au tableau de la page 15.

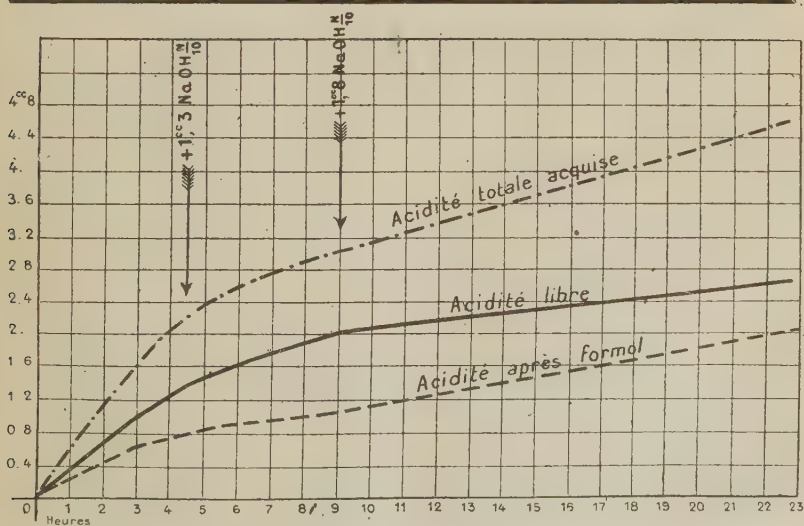
EXP. II. — a) Dans cette expérience on fait agir 1 cent. cube de solution de trypsine de la dilution suivante : trypsine-test, 12 cent. cubes ; solution physiologique, 20 cent. cubes sur 5 c.c. gélatine-test, non dialysée, neutralisée au tournesol.

ACIDITÉS CALCULÉES en c. c. NaOH N/10 EN PRÉSENCE DE PHÉNOLPHTALÉINE	TEMPS DE DIGESTION EN HEURES, A 41°						
	3	6	9	15	24	33	38
Acidité directement titrable (corrigée).	1	1,5	1,7	2	2,3	2,6	2,7
Acidité après formol (corrigée).	0,6	0,9	1,1	1,7	1,9	2,5	2,9
Acidité totale acquise (après correction).	1,6	2,4	2,8	3,7	4,2	5,1	5,6



b) Mêmes dispositions que dans l'expérience précédente.

ACIDITÉS CALCULÉES en c. c. NaOH N/10 EN PRÉSENCE DE PHÉNOLPHTALÉINE	TEMPS DE DIGESTION EN HEURES, A 41°					
	3	4 1/2	6 1/2	9	24	32
Acidité directement titrable (corrigée) .	1	1,4	1,7	2	2,6	2,9
Acidité titrable après formol (corrigée) .	0,6	0,8	0,9	1	2	2,4
Acidité totale acquise (corrigée)	1,6	2,2	2,6	3	4,6	5,3



GRAPHIQUES 3 et 4. — Le premier correspond au tableau de la page 16 ;
le deuxième au tableau ci-dessus.

Dans cette expérience, on ajoute, après le titrage de 4 h. 1/2, 1 cent. cube de soude N/10 dans chacun des tubes, on obtient ainsi la neutralisation presque totale de l'acidité libre.

Même opération est faite après le titrage de 9 heures, on ajoute 1 c.c. 8 de soude N/10.

La neutralisation ne fait pas reprendre à la diastase sa vitesse primitive d'hydrolyse; elle favorise néanmoins légèrement la continuation de l'action.

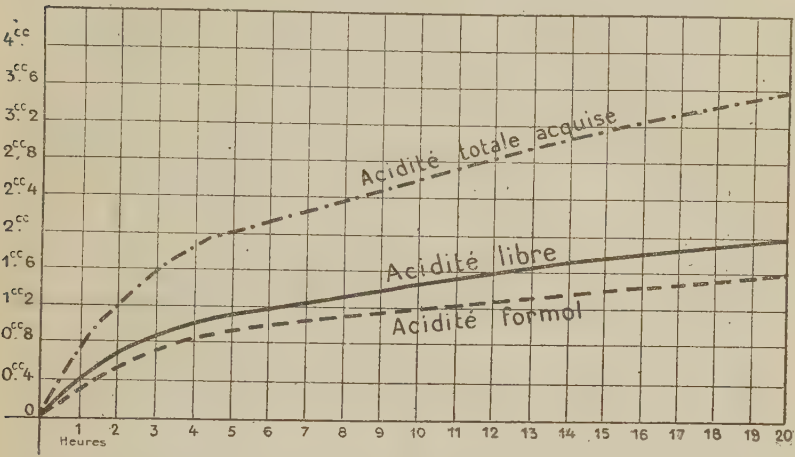
EXP. III. — a) Sur 5 cent. cubes de gélatine-test dialysée (dialyse de 3 jours), on fait agir 0 c.c. 3 de trypsine-test, additionnée de 0 c.c. 7 de solution physiologique.

ACIDITÉS CALCULÉES en c. c. NaOH N/10 EN PRÉSENCE DE PHÉNOLPHTALÉINE	TEMPS DE DIGESTION EN HEURES, A 41°						
	2	3	5	15	20	24	40
Acidité directement titrable (corrigée)	0,6	0,8	1,30	1,70	2,1	2,40	2,30
Acidité après formol (corrigée)	0,45	0,65	0,95	1,55	1,9	1,95	2,65
Acidité totale acquise (après correction)	1,05	1,45	2,23	3,25	4,0	4,05	4,95

b) A 5 c.c. de gélatine-test dialysée (dialyse de 7 jours), on ajoute et 0 c. c. 3, d'autre trypsine-test, on obtient les résultats obtenus dans ces deux expériences.

ACIDITÉ CALCULÉES EN C. C. NaOH N/10 EN PRÉSENCE DE PHÉNOLPHTALÉINE	TEMPS DE DIGESTION			
	1/2		1	
	0,3	0,6	0,3	0,6
Acidité directement titrable (corrigée)	0,25	0,45	0,4	0,70
Acidité après formol (corrigée)	0,15	0,3	0,3	0,45
Acidité totale acquise (corrigée)	0,4	0,75	0,7	1,15

Dans le graphique ci-dessous ainsi que dans les graphiques qui précèdent, les chiffres portés en ordonnées mesurent en



GRAPHIQUE 5. — Correspond à l'action de 0 c.c. 3 de trypsine du tableau ci-dessous pages 18 et 19.

centimètres cubes de solution décimormale de soude, l'acidité apparue au cours de la digestion.

c.c. de solution de NaCl physiologique + 0 c.c. 6 d'une part,
t, de trypsine-test,
ériences sont consignées ci-dessous :

HEURES, A 41°													
2		3		4 1/2		14		20		26		42	
3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6
55	0,85	0,85	1,25	1,05	1,55	1,75	2,25	2,	2,4	2,05	2,55	»	2,85
40	0,70	0,7	1	0,9	1,25	1,4	1,90	1,6	2,2	1,75	2,4	»	2,8
05	1,55	1,55	2,25	1,95	2,80	3,15	4,15	3,65	4,6	3,80	4,95	»	5,65

EXP.^e IV. — *Action de l'unité tryptique sur l'unité de test
(gélatine dialysée pendant 7 jours).*

ACIDITÉS CALCULÉES en c. c. NaOH N/10 EN PRÉSENCE DE PHÉNOLPHTALÉINE	TEMPS DE DIGESTION EN HEURES, A 41°							
	6	8	10	12	15	19	21	23
Acidité libre (corrigée) . . .	0,525	0,625	0,675	0,725	0,725	0,8	0,825	0,825
Acidité formol (corrigée) . .	0,35	0,45	0,55	0,6	0,6	0,65	0,65	0,65
Acidité totale acquise (corrigée)	0,87	1,07	1,22	1,32	1,32	1,45	1,47	1,47

Comme cette expérience le démontre, on peut considérer que l'action de l' « unité tryptique » sur l' « unité de test » est éteinte après 18 heures d'activité.

C'est ce résultat qui nous a fait choisir la durée de 18 heures comme temps normal de nos expériences sur l'action anti-tryptique du sérum. Nous revenons maintenant à celle-ci. Les expériences que nous venons de rapporter sur la digestion de la gélatine par la trypsine constituent la base de notre procédé pour établir le graphique du mouvement de la protéolyse de la gélatine par la trypsine, en présence de sérum sanguin et déterminer l' « optimum réel ».

B. — ACIDIFICATION DU MILIEU GÉLATINE-TRYPSINE
EN PRÉSENCE DE VOLUMES VARIABLES DE SÉRUM SANGUIN.
L'OPTIMUM RÉEL

En opérant dans les conditions fixées ci-dessus, une digestion de la gélatine par la trypsine, en présence de sérum sanguin, on observe une plus ou moins grande acidification du milieu. Celle-ci est en raison inverse de la quantité de sérum pour un sérum désigné; pour une même quantité de sérums différents, elle est en raison inverse du pouvoir antidiastasique de chacun d'eux.

Théoriquement, pour une quantité suffisante de sérum, on devrait atteindre le zéro d'acidification; on aurait ainsi

l'optimum *absolu*. Or, dans le cas le plus habituel — sauf exception rare — même pour les sérums très antidiastatiques : cheval, cobaye, homme, mouton, il n'y a jamais de zéro d'acidification. L'acidité acquise, la plus basse, est de 0 c.c. 05 à 0 c.c. 1 de soude N/10. Pour faible que soit la digestion représentée par ces chiffres, elle n'en existe pas moins, et ceci nous permet de dire que :

a) *Il n'y a pas, habituellement, d'inhibition absolue du ferment par le sérum ;*

b) *Quand une certaine inhibition est réalisée, on ne la dépasse pas, quelle que soit la quantité de sérum en présence.*

Au contraire, on peut voir dans certains cas le graphique de la protéolyse se redresser, après avoir atteint un minimum. On peut constater ce fait avec le sérum de chien. De ces conclusions, il résulte que :

L'« optimum réel », c'est la plus petite quantité de sérum qui, en présence de l'unité tryptique et dans des conditions telles que celle-ci épuise normalement son action, entraîne l'inhibition absolue ou presque absolue de l'unité tryptique. Cette plus petite quantité de sérum est déterminée par l'essai pour lequel l'acidité totale acquise au cours d'une digestion de 18 heures est la plus faible ; exceptionnellement, elle peut être égale à zéro.

Voici comment nous déterminons cette troisième valeur :

C. — CONSTRUCTION DU GRAPHIQUE DE LA PROTÉOLYSE EN PRÉSENCE DE QUANTITÉS VARIABLES DE SÉRUM SANGUIN

Après 18 heures d'étuve, on titre l'*acidité totale acquise*. On peut faire cette opération en deux temps : chercher d'abord le taux de l'acidité libre, puis celui de l'acidité déplacée par le formol. En pratique, il est préférable de faire immédiatement la recherche de l'acidité totale.

On portera alors en ordonnées les quantités de soude N/10 nécessaires à la neutralisation totale de chaque essai, en abscisses on porte la quantité de sérum en action.

Nous faisons seulement le graphique des doses nécessaires à la recherche de l'optimum, le graphique pour le « seuil » paraissant sans intérêt.

Voici comment l'on pratique l'opération en deux temps :

1° *Acidité libre.* — Au bout d'une heure (recherche du seuil), après 18 heures (recherche de l'optimum), on additionne chaque essai de V gouttes de solution alcoolique de phénolphthaléine à 1 p. 100 ; on ajoute par gouttes la solution décimale de soude, on s'arrête au virage rose ou violet faible.

2° *Acidité libérable par le formol.* — A l'essai qui vient de servir à la recherche de l'acidité libre, on ajoute 10 cent. cubes d'une solution de formol à 40 p. 100 diluée de moitié avec de l'eau distillée et neutralisée. jusqu'au virage rose très pâle, à la phénolphthaléine. On vérifie chaque fois la neutralité de cette solution. Si on dépasse le virage, on revient à la neutralité par l'addition d'une petite quantité de formol non neutralisé.

L'acidité libérée par le formol est titrée comme ci-dessus. L'acidité libre + l'acidité formol donnent l'acidité totale. L'acidité totale acquise est faite de l'acidité totale diminuée de l'acidité libre et de l'acidité formol préexistantes dans le test et le sérum en présence.

En pratique, il est inutile de calculer les deux acidités, on cherche directement l'acidité totale.

Je donne ci-dessous les résultats obtenus dans la recherche des valeurs limites d'un sérum de cobaye.

Recherche du seuil (après 1 heure, à 41°).

QUANTITÉ DE SÉRUM	ACIDITÉ LIBRE	ACIDITÉ FORMOL	ACIDITÉ TOTALE	TEMPS de GÉLIFICATION en minutes
	acquise en c. c. NaOH N/10	acquise en c. c. NaOH N/10	acquise en c. c. NaOH N/10	
0 c. c. 001	0,175	0,775	0,250	∞
0 c. c. 002	0,175	0,75	0,225	43
0 c. c. 003	0,15	0,725	0,175	42
0 c. c. 004	0,15	0,725	0,175	40
0 c. c. 005	0,12	0,7	0,120	8
Témoin trypsine.	0,2	0,775	0,275	∞
Témoin NaCl.	0,075	0,625	—	3
Témoin NaCl.	0,075	0,625	—	3

D'après la définition que nous avons donnée du « seuil », cette valeur est représentée ici par 0 c. c. 002.

Recherche de l'optimum réel (après 18 heures, à 41°).

QUANTITÉ DE SÉRUM	ACIDITÉ LIBRE acquise en c c. NaOH N/10	ACIDITÉ FORMOL acquise en c. c. NaOH N/10	ACIDITÉ TOTALE acquise en c. c. NaOH N/10	TEMPS de GÉLIFICATION en minutes
0 c. c. 01	0,6	1,3	1,275	∞
0 c. c. 02	0,5	1,25	1,125	∞
0 c. c. 03	0,5	1,2	1,075	∞
0 c. c. 04	0,4	1,	0,775	∞
0 c. c. 05	0,2	0,75	0,325	∞
0 c. c. 06	0,1	0,7	0,175	12
0 c. c. 07	0,1	0,675	0,150	8
0 c. c. 08	0,075	0,675	0,125	6
0 c. c. 09	0,075	0,675	0,125	6
0 c. c. 1	0,075	0,650	0	5
0 c. c. 12	0,075	0,7	0	5
0 c. c. 14	0,075	0,7	0	5
0 c. c. 16	0,075	0,75	0,05	6
Témoin trypsine.	0,6	1,25	1,225	∞
— 0,1 sérum.	0,075	0,65	—	5
— 0,15 sérum.	0,075	0,7	—	6
— NaCl.	0,075	0,55	—	5

Dans cet exemple, l'*optimum réel* est marqué par une acidification nulle; cet optimum est égal à 0 c. c. 1; l'*optimum approché* serait 0 c. c. 07. Le pouvoir antitryptique de ce sérum est donc défini par les 3 valeurs :

Seuil 0 c. c. 002
 Optimum approché. 0 c. c. 07
 Optimum réel 0 c. c. 1

Il serait sans intérêt de multiplier les tableaux de ce genre. Il faut évidemment toujours établir ceux-ci; on construira le graphique d'après leurs données.

Je présente ci-contre (Pl. I, II, III, IV) un certain nombre de graphiques concernant les sérums de cheval, d'homme, de cobaye, de mouton, de lapin, de chien, d'anguille et de poule, ces deux derniers seulement à titre d'indication générale.

Le graphique étant tracé, il faut en faire la lecture. Celle-ci permettra de classer deux sérums, d'après l'analyse de leur graphique de protéolyse. Trois points sont importants à considérer :

- 1° *Le taux de l'acidification en présence de 0 c.c. 01 de sérum ;*
- 2° *La situation des points critiques, c'est-à-dire le numéro des essais pour lesquels il y a une chute importante de l'acidification comparée à celle de l'essai immédiatement précédent ;*
- 3° *L'acidité la plus basse obtenue ; elle donnera l'« optimum réel ».*

D'une façon générale on note l'allure du graphique, et l'on peut comparer l'acidification d'autres essais homologues. De ces graphiques il résulte un fait important, celui-ci : Pour les sérums de cheval, cobaye, mouton, homme, chien, l'*optimum réel* est compris entre 0 c.c. 07 — 0 c.c. 1.

Le volume de sérum mesurant l'« *optimum réel* » est compatible avec une trace de digestion, elle se traduit par une acidification neutralisée par : 0 c.c. 05 — 0 c.c. 1 de soude N/10.

Dans les graphiques ci-contre nous avons en *ordonnées* l'acidité totale acquise, calculée en cent. cubes de NaOH N/10 et en *abscisses* les volumes de sérum.

III

APPLICATION

DES DONNÉES PRÉCÉDEMMENT ÉTABLIES A L'ÉTUDE COMPARÉE DU POUVOIR ANTITRYPTIQUE DE PLUSIEURS SÉRUMS

Les résultats exposés au cours des deux chapitres précédents montrent que pour caractériser la valeur antitryptique d'un sérum : trois valeurs au moins doivent être déterminées, le seuil et les optima. Pour le sérum normal d'animaux de même espèce ces valeurs sont sensiblement constantes. Nous en avons fixé les variantes possibles pour l'homme, le cobaye, le cheval, le mouton, le chien, le lapin, la poule. Comme nous le savons (voir page 10) la valeur moyenne de l'« optimum approché » est égale pour les quatre premières espèces à 0 c.c. 05 avec une variation en deçà ou au delà égale à 0 c.c. 01.

Cette valeur comme les deux autres (nous parlons de l'*optimum approché* parce qu'elle est la plus importante) est établie en fonction du volume du sérum.

Dans la recherche des constantes antitryptiques du sérum d'une espèce animale nous ne faisons intervenir la notion de

temps que dans les limites extrêmes de l'action de l'unité tryptique : le début et la fin ; nous négligeons les stades intermédiaires dont l'examen ne répond pas à notre demande : recherche de la valeur inhibitrice.

D'une façon générale l'évaluation numérique des trois valeurs considérées satisfait à ce qu'on attend de la mesure des propriétés antitryptiques d'un sérum. Elle permet de classer le sérum comme normal ou non et, dans cette dernière possibilité, elle indique le sens de la variation et chiffre celle-ci.

Il est néanmoins des exemples, particulièrement lorsqu'il s'agit de comparer l'action de différents sérums d'une même espèce animale, où nous pouvons désirer une analyse plus fine de leur action antiprotéolytique.

Dans ce but *on conçoit que la notion de temps doit intervenir dans la conduite de l'expérience* ; elle est même ici capitale ; aussi, dans l'application à l'étude comparée de l'action antitryptique de plusieurs sérums des données établies précédemment on procédera de la façon suivante :

1° Détermination des constantes d'espèce : seuils et optima ;

2° Détermination pour un ou plusieurs volumes déterminés de chaque sérum du mouvement de la protéolyse. Construction des courbes selon les données recueillies.

Le choix du ou des volumes de sérum à opposer à l'action tryptique est important. Il va de soi que ce volume ne sera pas celui d'une valeur limite, puisque ce que nous cherchons en résumé, c'est la valeur propre des volumes intermédiaires aux volumes limites.

EXEMPLE. — Soit à déterminer la valeur antitryptique de deux sérums humains : Sérum A, Sérum B.

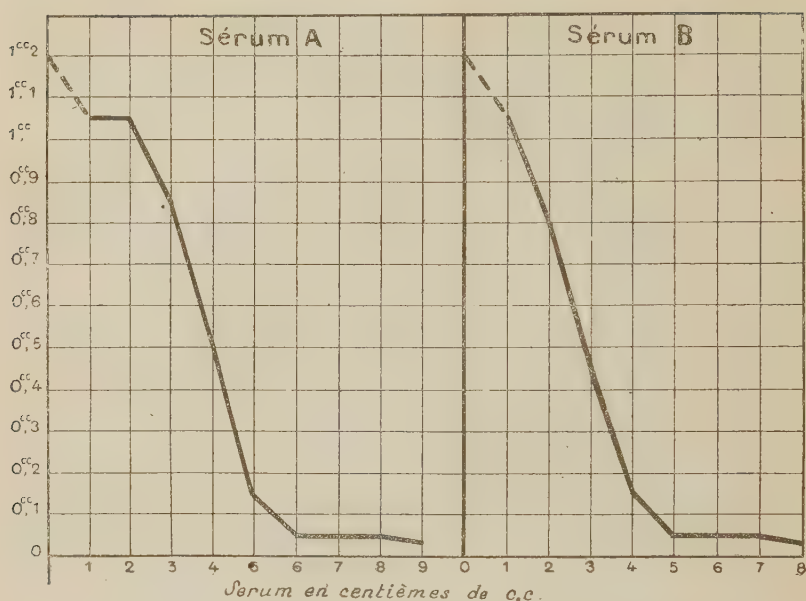
1° Recherche du seuil (voir page 22).

2° Recherche des optima (voir page 23).

La première recherche nous donne 0,002 pour les deux sérums. La seconde donne :

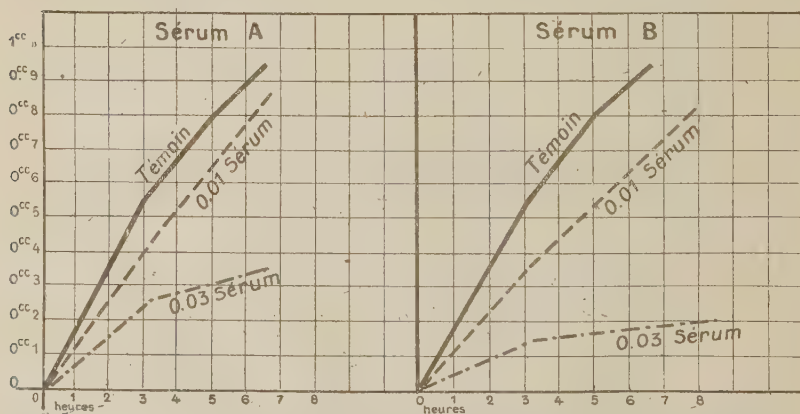
$$\begin{array}{lcl} \text{Optimum approché.} & \left\{ \begin{array}{l} \text{Sérum A} = 0,06 \\ \text{Sérum B} = 0,05 \end{array} \right. \\ \text{Optimum réel} & \left\{ \begin{array}{l} \text{Sérum A} \geq 0,08 \\ \text{Sérum B} \geq 0,07 \end{array} \right. \end{array}$$

Dans ce cas nous pouvons dire déjà que le pouvoir antitryptique du sérum B est plus fort que celui du sérum A.



GRAPHIQUE 16. — Établi selon les données du paragraphe B, chapitre II, le sérum A était un sérum normal, le sérum B un sérum positif à la réaction de Wassermann.

Les deux graphiques ci-dessus le démontrent d'ailleurs nettement. L'étude du mouvement de la protéolyse en présence de 0,01 et 0,03 de chaque sérum rend cette conclusion absolue. Dans cette dernière recherche on procède comme suit :



GRAPHIQUE 17. — Courbes établies selon les données du paragraphe A, chapitre II.

On fait agir de chaque sérum 0,01 et 0,03 sur l'unité tryptique en présence de l'unité de test à 41°. On suit pendant les sept premières heures le mouvement de la protéolyse dans chaque cas ; on construit les courbes. (Courbes 17). L'allure de celles-ci permettra de se prononcer définitivement sur la valeur antitryptique comparée des sérums en étude.

CONCLUSIONS

L'action antitryptique du sérum sanguin n'a pas été généralement étudiée jusqu'ici avec des méthodes suffisamment rigoureuses.

Ce mémoire a pour but de présenter une méthode précise susceptible de donner au pouvoir antitryptique d'un sérum une représentation numérique, objective, réelle, en même temps qu'une représentation graphique.

Les recherches exposées ici ont eu pour objets les sérums normaux de quelques Mammifères : homme, cheval, cobaye, mouton, chien, lapin ; d'un poisson : l'anguille ; d'un oiseau : la poule.

Elles constituent les données fondamentales sur lesquelles notre expérimentation peut désormais s'appuyer.

En dehors de l'exposé proprement dit de la méthode suivie et des résultats de son application sur les sérums normaux, il ressort de ce mémoire quelques faits de portée générale ; ils concernent :

- a) La digestion tryptique de la gélatine ;
- b) Le rapport très étroit existant entre les sérums de Mammifères relativement à leur pouvoir antitryptique absolu ;
- c) La non-intervention des lipoides du sérum dans la genèse du pouvoir antitryptique de ce liquide ; les sérums des animaux qui, comme l'anguille et la poule, sont riches en lipoides se montrent en effet le plus faiblement antitryptiques (1).

Paris, 1^{er} octobre 1918.

(1) Pour la teneur du sérum sanguin en lipoides, consulter : MATER et SCHAEFFER ; *Jour. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1913, p. 984.

LA DIFFUSIBILITÉ DU VIRUS RABIQUE

par P. REMLINGER.

Les expériences sur lesquelles on pouvait s'appuyer pour avancer que le virus rabique — virus filtrable — était également un virus diffusible, c'est-à-dire susceptible de se propager de proche en proche comme le sucre dans l'eau où il se dissout ou comme la matière colorante dans le tissu qu'elle imprègne, ces expériences étaient, jusqu'à maintenant, tout au moins à notre connaissance, au nombre de trois.

1° Bujwid (1) prend un cerveau sain de veau; il le recouvre d'un cerveau rabique et les place l'un et l'autre à l'obscurité au-dessus d'une couche d'acide pyrogallique, dans une atmosphère privée d'oxygène. Quelques jours plus tard, le cerveau neuf donne la rage au lapin. L'expérience réussit même à la température de la chambre et si le cerveau sain est remplacé par du foie, mais l'absence ou, tout au moins, une très grande diminution d'oxygène est une condition indispensable à la réussite de l'opération.

2° Après avoir répété avec succès cette expérience, Nitsch (2) a vu que, semblablement, si on plonge dans l'eau distillée ou de la solution physiologique, mais toujours dans une atmosphère privée d'oxygène, un cerveau de lapin rabique, le virus passe après 23 heures déjà dans le liquide.

3° D'expériences entreprises sur la virulence comparée de la substance grise et de la substance blanche pendant la vie et à différents moments après la mort du lapin — expériences extrêmement délicates au sujet desquelles il convient de faire

(1) BUJWID, cité par NITSCH, Expériences sur la rage de laboratoire. *Virus fixe*. 3^e partie. *Bulletin de l'Académie des Sciences de Cracovie*, juin 1905.

(2) NITSCH, *Loc. cit.*

les plus expresses réserves — le même auteur conclut qu'aux premiers stades de la maladie et jusqu'au décès, il existe, au profit de la première, une différence très marquée entre la virulence de la substance grise et celle de la substance blanche. Pour le virus fixe, la substance grise se montrerait de 20 à 100 fois plus virulente que la substance blanche. Pour le virus des rues, la substance grise ne serait qu'environ deux fois plus virulente. Aussitôt après la mort, la substance blanche commence à gagner en virulence au détriment de sa voisine en sorte que, plus le temps écoulé après la mort se prolonge et moins l'écart est considérable.

Nous avons jugé intéressant de reprendre ces expériences en nous plaçant dans des conditions moins exceptionnelles. Nous étudierons successivement la diffusibilité du virus rabique en dehors de l'organisme et dans l'organisme lui-même.

I

DIFFUSIBILITÉ

DU VIRUS RABIQUE, EN DEHORS DE L'ORGANISME

Un ou deux cerveaux de cobaye ayant succombé soit au virus fixe, soit au virus de rue sont lavés à l'eau stérilisée, de façon à éliminer le sang ou le liquide céphalo-rachidien qui pourraient leur adhérer, puis immergés dans un pot-ban renfermant de la solution de Locke stérilisée également. Le flacon est, pendant 1 à 4 jours, laissé à l'étuve à 37° ou maintenu à la température du Laboratoire. La putréfaction s'établit rapidement. On passe une fois ou deux le liquide à travers un papier Chardin afin de retenir la plupart, sinon la presque totalité des micro-organismes qui seraient capables de faire mourir de septicémie ou de suppuration les animaux inoculés et on l'injecte à la dose de 2 à 3 cent. cubes dans les muscles de la nuque du cobaye ou du lapin. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

N ^{os} D'ORDRE	DATE	QUANTITÉ ET NATURE DU VIRUS	AGE DU VIRUS	MODE D'INOCULATION ET DOSE	RÉSULTATS de L'INOCULATION
1	27 déc.	2 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	2 jours, T. ambiante.	Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c. et demi. Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c. et demi.	Mort de rage. A résisté.
2	27 déc.	1 cerveau de lapin. Virus fixe.	3 jours, T. ambiante.	Lap. Muscles de la nuque. 3 c.c. Lap. Muscles de la nuque. 3 c.c.	A résisté. A résisté.
3	28 déc.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	4 jours, T. ambiante.	Cob. Muscles de la nuque. 3 c.c. Cob. Muscles de la nuque. 3 c.c.	Mort de rage. Mort de rage.
4	2 janv.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	4 jours, T. ambiante.	Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c. et demi. Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c. et demi.	A résisté. A résisté.
5	2 janv.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	3 jours, T. ambiante.	Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c. et demi. Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c. et demi.	Mort de septicémie le surlendemain. Mort de rage.
6	4 janv.	1 cerveau de lapin et 1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	4 jours, T. ambiante.	Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c. Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c.	A résisté. A résisté.
7	4 janv.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	1 jour, à 37°	Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c. Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c.	A résisté. A résisté.
8	7 janv.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	3 jours, à 37°	Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c. Cob. Muscles de la nuque. 2 c.c.	A résisté. A résisté.

Nos D'ORDRE	DATE	QUANTITÉ ET NATURE DU VIRUS	AGE DU VIRUS	MODE D'INOCULATION ET DOSE	RÉSULTATS de L'INOCULATION
9	11 janv.	2 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	2 jours, à 37°	Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c. Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c.	A résisté. A résisté.
10	11 janv.	2 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	1 jour, à 37°	Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c. Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c.	Mort de septicémie le surlendemain Mort de septicémie le surlendemain.
11	14 janv.	1 cerveau de lapin. Virus de rue.	2 jours, à 37°	Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c. Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c.	A résisté. A résisté.
12	17 janv.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	2 jours, à 37°	Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c. Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c.	Mort de rage. A résisté.
13	17 janv.	2 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	1 jour, à 37°	Cob. Muscles de la nuque. 3 c. c. Cob. Muscles de la nuque. 3 c. c.	Mort de rage. Mort de rage.
14	19 janv.	2 cerveaux de lapin. Virus de rue.	2 jours, à 37°	Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c. Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c.	A résisté. A résisté.
15	20 janv.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	2 jours, à 37°	Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c. Cob. Muscles de la nuque. 2 c. c.	A résisté. A résisté.

Ainsi, le plus grand nombre des animaux inoculés demeure bien portant (20 sur 30). Un très petit nombre (3 sur 30) succombe le lendemain ou le surlendemain de l'inoculation à une septicémie. D'autres (7 sur 30) succombent à la rage. Voici

du reste le détail des observations dans lesquelles un résultat positif a été obtenu :

Obs. I. — Le 25 décembre, deux cerveaux de cobaye ayant succombé au virus de rue sont lavés à l'eau physiologique puis immergés dans un flacon de sérum de Locke. Celui-ci est conservé dans la chambre noire des moelles à la température ambiante (1). Le 27, après deux jours, la putréfaction est très marquée. Le liquide est filtré à travers un papier Chardin puis inoculé à la dose de 2 cent. cubes 1/2 chaque fois dans les muscles de la nuque de deux cobayes. Le 8 janvier (12^e jour) l'un de ces animaux présente une paralysie à marche rapide; le soir, il est déjà couché sur le côté et agonise. Il est trouvé mort le 9 au matin. Le bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin. Celui-ci présente le 16 janvier (8^e jour) une rage paralytique type à évolution normale et meurt le 18, au 10^e jour. Le second cobaye est demeuré bien portant.

Obs. II. — Le 24 décembre, un cerveau de cobaye mort de rage à virus de rue est lavé à l'eau stérilisée puis conservé pendant 4 jours dans du liquide de Locke, à l'obscurité et à la température ambiante. Le 28 décembre, la putréfaction est intense. On filtre le liquide à travers un papier Chardin et on l'inocule à la dose de 3 cent. cubes chaque fois dans les muscles de la nuque de deux cobayes. Le 3 janvier (11^e jour) l'un de ces animaux présente les symptômes d'une rage paralytique à marche rapide. Bientôt, il se couche sur le côté, agonise et meurt. Son bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin. Le 16 janvier (7^e jour) celui-ci présente les symptômes caractéristiques d'une rage paralytique à laquelle il succombe le lendemain (8^e jour).

Le deuxième cobaye demeure bien portant jusqu'au 26 janvier (29^e jour). A cette date, il est trouvé mort le matin, alors que, la veille, il n'avait attiré l'attention par aucun symptôme (2). Son bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin. Celui-ci, suspect le 3 février (8^e jour), est complètement paralysé le lendemain. Le soir, il est déjà couché sur le côté. Il meurt dans la journée du 5 février (10^e jour).

Obs. III. — Le 30 décembre, un cerveau de cobaye mort de rage des rues est mis dans du liquide de Locke et conservé à l'obscurité pendant 3 jours. Le 2 janvier, la putréfaction est très avancée. Le liquide est passé à travers un papier Chardin et inoculé à raison de 2 cent. cubes 1/2 par animal dans les muscles de la nuque de deux cobayes. L'un d'eux présente le lendemain les symptômes d'une septicémie à laquelle il succombe le 4 janvier. L'autre demeure très bien portant jusqu'au 17 janvier. Il est trouvé mort le 17 au matin (15^e jour). Son bulbe est inoculé dans le cerveau d'un lapin. Le 25 janvier (8^e jour) celui-ci cesse de manger; le soir, il présente un commencement de paralysie. Complètement paralysé le lendemain (9^e jour) il succombe le 27 (10^e jour) à une rage classique.

Obs. IV. — Le 15 janvier 1917, le cerveau d'un cobaye mort de la rage des rues est mis dans du liquide de Locke et conservé pendant 2 jours à l'étuve

(1) Nous avons renoncé depuis longtemps à l'étuve à 20-22°.

(2) P. REMLINGER. Contribution à l'étude de la rage du Cobaye. Ces *Annales*, t. XXXI, p. 537-570.

à 37°. Le 17, la putréfaction est intense. La solution de Locke est filtrée à travers un papier Chardin et inoculée dans les muscles de la nuque de deux cobayes à raison de 2 cent. cubes par animal. L'un d'eux est demeuré vivant et bien portant. L'autre présente, le 26 janvier (9^e jour), une paralysie du train postérieur de caractère nettement rabique qui ne tarde pas à gagner le train antérieur. L'animal est sacrifié pour une expérience un peu avant sa mort. Le bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin. Celui-ci, suspect le 2 février (7^e jour), présente le lendemain et le surlendemain tous les symptômes de la rage paralytique à laquelle il succombe le 5 (10^e jour).

Obs. V. — Le 16 janvier, deux cerveaux de cobayes morts de rage à virus de rue sont plongés dans du sérum de Locke. Le flacon est mis à l'étuve à 37°. Le lendemain 17, la putréfaction est peu marquée. Le liquide dégage seulement une odeur un peu fade. On passe à travers un papier Chardin et on inocule deux cobayes dans les muscles de la nuque à raison de 3 cent. cubes par animal. Le 29 janvier (12^e jour) ils présentent l'un et l'autre une rage paralytique caractéristique et de symptomatologie identique. La marche de la maladie est très rapide (il s'agit de tous jeunes cobayes). Le soir, ils sont déjà agonisants et on les trouve morts l'un et l'autre le 30 janvier au matin (13^e jour). Les deux bulbes servent à faire des passages. Les deux lapins, inoculés sous la dure-mère, présentent dès le 5 février (6^e jour) les premiers symptômes d'une rage paralytique classique à laquelle ils succombent respectivement les 7 et 8 février (8^e et 9^e jours).

Comment ce passage du virus dans le liquide de Locke doit-il être interprété? Il ne semble pas que ce puisse être comme une culture puisque, à trois reprises, nous l'avons vu s'effectuer à la température très basse de 10°-15°, mais comme une simple diffusion. Nous avons du reste obtenu avec la vulgaire eau salée à 8 pour 1.000 — maintenue même à la glacière dans une observation — des résultats analogues quoique légèrement inférieurs (3 animaux morts de rage sur 30 inoculés). Il était procédé absolument comme dans la série d'expériences précédentes. Le cerveau d'un cobaye ou d'un lapin mort de rage à virus de rue ou à virus fixe était mis dans un flacon contenant de l'eau physiologique. Le tout était déposé à la glacière, à l'étuve à 37° ou dans la chambre de dessiccation des moelles (obscurité, température ambiante). Après 1 à 3 jours, le liquide était passé à travers un papier Chardin et inoculé sous la peau du ventre ou dans les muscles de la nuque du lapin ou du cobaye. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

N ^{os} D'ORDRE	DATE	QUANTITÉ ET NATURE DU VIRUS	AGE DU VIRUS	MODE D'INOCULATION ET DOSE	RÉSULTATS de L'INOCULATION
1	24 oct.	1 cerveau de cobaye. Virus fixe.	2 jours, à 37°	Lap. Peau du ventre. 2 c. c. Lap. Muscles de la nuque. 2 c. c.	Mort de rage. Mort de rage.
2	28 oct.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	2 jours, à la glacière.	Lap. Peau du ventre. 2 c. c. Cob. Peau du ventre. 2 c. c.	A résisté. A résisté.
3	24 nov.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	3 jours, à 37°	Lap. Muscles de la nuque. 3 c. c. Cob. Muscles. 2 c. c.	A résisté. Mort de septicémie.
4	26 nov.	1 cerveau de lapin. Virus de rue.	3 jours, à la glacière.	Lap. Muscles de la nuque. 3 c. c.	Mort de rage.
5	30 nov.	1 cerveau de lapin. Virus fixe.	1 jour, à 37°	Lap. Muscles de la nuque. 3 c. c. Lap. Muscles de la nuque. 5 c. c.	A résisté. A résisté.
6	1 ^{er} déc.	1 cerveau de lapin. Virus fixe.	2 jours, à 37°	Lap. Muscles de la nuque. 3 c. c. Lap. Muscles de la nuque. 5 c. c.	A résisté. A résisté.
7	2 déc.	1 cerveau de lapin. Virus fixe.	3 jours, à 37°	Lap. Muscles de la nuque. 3 c. c. Lap. Muscles de la nuque. 5 c. c.	A résisté. A résisté.
8	2 déc.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	1 jour, à 37°	Cob. Nuque. 2 c. c. Cob. Nuque. 2 c. c.	A résisté. A résisté.
9	3 déc.	1 cerveau de lapin. Virus fixe.	4 jours, à 37°	Lapin. Nuque. 5 c. c.	A résisté.

N ^{os} D'ORDRE	DATE	QUANTITÉ ET NATURE DU VIRUS	AGE DU VIRUS	MODE D'INOCULATION ET DOSE	RÉSULTATS de L'INOCULATION
10	3 déc.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	2 jours, à 37°	Cob. Nuque. 2 c.c. Cob. Nuque. 2 c.c.	A résisté. A résisté.
11	6 déc.	1 cerveau de cobaye. Virus fixe.	2 jours, à 37°	Cob. Nuque. 2 c.c. Cob. Nuque. 3 c.c.	A résisté. Mort de septicémie.
12	7 déc.	1 cerveau de cobaye. Virus fixe.	3 jours, à 37°	Cob. Nuque. 1 c.c. Cob. Nuque. 2 c.c.	A résisté. Mort de septicémie.
13	7 déc.	1 cerveau de lapin. Virus fixe.	2 jours, à 37°	Cob. Nuque. 3 c.c. Cob. Nuque. 3 c.c.	A résisté. A résisté.
14	8 déc.	1 cerveau de cobaye. Virus fixe.	4 jours, à 37°	Cob. Nuque. 2 c.c. Cob. Nuque. 3 c.c.	A résisté. A résisté.
15	9 déc.	1 cerveau de lapin. Virus fixe.	4 jours, à 37°	Cob. Nuque. 3 c.c. Cob. Nuque. 3 c.c.	A résisté. A résisté.
16	11 déc.	1 cerveau de lapin. Virus fixe.	6 jours, à 37°	Cob. Nuque. 3 c.c. Cob. Nuque. 3 c.c.	A résisté. A résisté.

Ainsi, sur 30 animaux inoculés, 24 ont survécu; 3 sont morts de septicémie; 3 ont succombé à la rage. Voici le détail des expériences dans lesquelles un résultat positif a été obtenu.

Obs. VI. — Le 22 octobre, le cerveau d'un cobaye ayant succombé au virus fixe est mis dans de l'eau physiologique et conservé jusqu'au surlendemain à l'étuve à 37°. A ce moment, la putréfaction est déjà très marquée. On passe successivement à travers trois mousselines et on injecte 2 cent. cubes du filtrat dans les muscles de la nuque d'un premier lapin et sous la peau du ventre d'un second.

Le premier présente les premiers symptômes de rage le 10 novembre (17^e jour). Il est franchement paralysé le 11 et meurt le 12 au soir (19^e jour).

Un lapin inoculé sous la dure-mère avec son bulbe meurt de rage paralytique le 22 novembre (9^e jour).

Le lapin inoculé sous la peau commence à présenter, le 14 novembre (21^e jour), sous forme de tristesse et d'inappétence, les premiers symptômes de la rage. Le lendemain, il est paralysé et on assiste à l'évolution d'une rage paralytique classique à laquelle il succombe le 17 (24^e jour). Un lapin est, pour plus de sûreté, inoculé avec le bulbe. Premiers symptômes de rage le 26 novembre (9^e jour). Mort le 29 (12^e jour).

Obs. VII. — Le 23 novembre, le cerveau d'un lapin mort de rage des rues est mis dans de l'eau physiologique et conservé à la glacière jusqu'au 26. A cette date, l'eau salée est passée à travers trois étoffes de mousseline et inoculée à la dose de 3 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un lapin. Le 8 décembre (12^e jour) début d'une rage paralytique à laquelle l'animal succombe le lendemain soir. Le bulbe est inoculé par trépanation à deux lapins. Tous deux présentent le 17 (8^e jour) les premiers symptômes d'une rage paralytique classique à laquelle ils succombent le 19 (10^e jour).

A la lecture des observations qui précèdent, une objection se présente naturellement à l'esprit. Ainsi que nous l'avons vu, dans le liquide de Locke comme dans l'eau physiologique, les cerveaux se putréfient rapidement. Ne peut-on pas supposer dès lors que la putréfaction amène une désintégration de la substance nerveuse à la faveur de laquelle celle-ci passerait dans le liquide, entraînant le virus à sa suite? Les expériences précitées prouveraient donc simplement que le virus traverse le papier Chardin, ce qui n'a nullement besoin d'être démontré. Cette interprétation — la première que nous ayons donnée nous-même de nos résultats positifs — paraît détruite par les deux constatations suivantes :

1^o La putréfaction du cerveau rabique est au moins aussi rapide dans l'huile d'olive ou l'huile d'Argan (1) que dans l'eau physiologique ou le sérum de Locke. Or, nous immergeons dans l'une ou l'autre de ces deux huiles des cerveaux de lapin ou de cobaye ayant succombé au virus de rue ou au virus fixe. Les flacons sont, de même que dans les expériences précédentes, conservés plusieurs jours à la glacière, à la température ambiante ou à l'étuve à 37°. L'huile est alors passée à travers une mousseline et inoculée à des doses variant de 10 à

(1) Huile extraite du fruit de l'arganier (*Argania sideroxyton*), arbre très répandu dans le Sud marocain.

20 cent. cubes dans les muscles de la nuque du lapin ou du cobaye. Aucun des animaux traités ne prend la rage;

2° Nous supprimons la putréfaction en immergeant les cerveaux dans de la glycérine dont M. Roux a, comme on sait, fait connaître les propriétés éminemment conservatrices à l'égard du virus rabique. Les flacons sont conservés plusieurs jours à la glacière, à la chambre noire ou à l'étuve; après quoi, la glycérine est passée à travers une étoffe ou un filtre de papier gris et injectée à la dose de 5 cent. cubes dans les muscles de la nuque du cobaye, à la dose de 10-12 cent. cubes dans les muscles de la nuque du lapin. Le tableau ci-dessous montre que le virus diffuse dans la glycérine (l'hypothèse d'une culture dans ce milieu ne saurait naturellement être envisagée) plus fréquemment que dans le sérum artificiel ou la solution de Locke.

N ^{os} D'ORDRE	DATE	QUANTITÉ ET NATURE DU VIRUS	AGE DU VIRUS	MODE D'INOCULATION ET DOSE	RÉSULTATS de L'INOCULATION
1	19 oct.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	3 jours, à la glacière.	Cob. Nuque. 5 c.c.	Mort le lendemain.
2	23 oct.	1 cerveau de cobaye. Virus fixe.	5 jours, à la glacière.	Lapin. Nuque. 10 c.c.	A résisté.
3	23 oct.	1 cerveau de cobaye. Virus fixe.	5 jours, à la glacière.	Cob. Nuque. 5 c.c.	A résisté.
4	23 oct.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	3 jours, à 37°	Lapin. Nuque. 10 c.c. Cob. Nuq. 5 c.c	A résisté. A résisté.
5	24 oct.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	4 jours, à la glacière.	Lapin. Nuque. 10 c.c.	A résisté.
6	26 oct.	1 cerveau de cobaye. Virus fixe.	5 jours, obscurité.	Lapin. Nuque 10 c.c.	A résisté.
7	28 oct.	1 cerveau de lapin. Virus fixe.	5 jours, à la glacière.	Lapin. Nuque. 10 c.c.	A résisté.

N ^{os} D'ORDRE	DATE	QUANTITÉ ET NATURE DU VIRUS	AGE DU VIRUS	MODE D'INOCULATION ET DOSE	RÉSULTATS de L'INOCULATION
8	28 oct.	1 cerveau de cobaye. Virus de rue.	3 jours, obscurité.	Cob. Nuque. 5 c. c.	Mort le jour même.
9	12 nov.	8 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	2 à 8 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 10 c. c.	Mort de rage.
10	16 nov.	8 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	6 à 12 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 20 c. c.	Mort le jour même.
11	17 nov.	4 cerveaux de lapin; 3 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	2 à 5 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 10 c. c.	Mort de rage.
12	18 nov.	7 cerveaux de lapin ou de cobaye. Virus de rue.	3 à 6 jours; obscurité.	Lapin. Nuque. 12 c. c.	Mort le lendemain.
13	19 nov.	7 cerveaux de lapin ou de cobaye. Virus de rue.	4 à 7 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 8 c. c.	A résisté.
14	21 nov.	7 cerveaux de lapin ou de cobaye. Virus de rue.	7 à 9 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 10 c. c.	A résisté.
15	2 nov.	8 cerveaux de lapin ou de cobaye. Virus de rue.	1 à 2 jours, à 37°	Lapin. Nuque. 10 c. c.	A résisté.
16	22 nov.	8 cerveaux de lapin ou de cob. Virus de rue.	2 à 3 jours, à 37°	Lapin. Nuque. 10 c. c.	A résisté.
17	23 déc.	8 cerveaux de lapin ou de cob. Virus de rue.	3 à 4 jours, à 37°	Lapin. Nuque. 10 c. c.	A résisté.
18	21 déc.	2 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	6 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 12 c. c.	A résisté.

N ^{os} D'ORDRE	DATE	QUANTITÉ ET NATURE DU VIRUS	AGE DU VIRUS	MODE D'INOCULATION ET DOSE	RÉSULTATS de L'INOCULATION
19	23 déc.	2 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	7 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 12 c.c.	A résisté.
20	24 déc.	6 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	6 à 8 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 12 c.c.	Mort de rage.
21	25 déc.	6 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	3 à 6 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 10 c.c.	Mort de rage.
22	26 déc.	4 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	9 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 10 c.c.	A résisté.
23	29 déc.	Plusieurs cerveaux de lapin et de cobaye. Virus fixe et virus de rue.	Plus d'une semaine.	Lapin. Nuque. 10 c.c.	Mort de rage.
24	27 janv.	7 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	5 à 8 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 10 c.c.	Mort le lendemain.
25	27 janv.	7 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	5 à 8 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 10 c.c.	Mort de rage.
26	27 janv.	7 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	5 à 8 jours, obscurité.	Cob. Nuque. 5 c.c.	A résisté.
27	27 janv.	7 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	5 à 8 jours, obscurité.	Cob. Nuque. 5 c.c.	A résisté.
28	3 fév.	5 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	5 à 8 jours, obscurité.	Lapin. Nuque. 10 c.c.	A résisté.
29	3 fév.	5 cerveaux de cobaye. Virus de rue.	5 à 8 jours, obscurité.	Cob. Nuque. 5 c.c.	A résisté.

Ainsi, sur 30 animaux inoculés, 19 sont demeurés bien portants, 5 sont morts le jour même ou le lendemain de l'inoculation, la glycérine étant, aux doses injectées, parfois mal sup-

portée par le lapin ou par le cobaye. Enfin, 6 ont succombé à la rage. Voici leurs observations :

Obs. VIII. — Du 4 au 10 novembre, 8 cerveaux de cobaye morts du virus des rues ont été mis dans un flacon de glycérine neutre à 30° Baumé et conservés à l'obscurité, à la température ambiante. Le 12, après 2 à 8 jours par conséquent, la glycérine est passée successivement à travers trois mousselines et inoculée à la dose de 10 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un lapin. Le 1^{er} décembre (19^e jour), l'animal présente une paralysie des muscles de la nuque. La tête tombante vient toucher le sol de la cage. Le lendemain, la paralysie paraît avoir gagné les muscles des gouttières vertébrales. L'animal est replié sur lui-même, la tête venant au contact du train postérieur. Amaigrissement. Dyspnée. Le soir, il s'étend sur le côté et commence d'agoniser comme un lapin rabique. Mort le 3 décembre (21^e jour). Le bulbe est inoculé par trépanation à un lapin qui succombe le 12 décembre (9^e jour) à la rage paralytique. L'allure de celle-ci ayant éveillé quelques soupçons, il est procédé à un 2^e passage (mort au 8^e jour), puis à un troisième (mort au 12^e jour d'une rage tout à fait caractéristique).

Obs. IX. — Du 12 au 15 novembre, 4 cerveaux de lapin et 3 cerveaux de cobaye (virus de rue) sont mis en glycérine et conservés à la chambre noire. Le 17 — après 2 à 5 jours par conséquent — la glycérine est passée successivement à travers trois mousselines et inoculée à la dose de 10 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un lapin. Le 9 décembre (22^e jour) tristesse, amaigrissement, inappétence, commencement de paralysie. Le lendemain, la paralysie est complète. Pour les besoins d'une expérience, l'animal est sacrifié un peu avant la mort. Le bulbe est inoculé dans le cerveau de deux cobayes. L'un et l'autre commencent à présenter le 15 décembre (5^e jour) des signes d'agitation. Ils succombent le lendemain à une rage furieuse extrêmement violente et tout à fait caractéristique.

Obs. X. — Du 16 au 18 décembre, 6 cerveaux de cobaye morts du virus des rues ont été mis en glycérine et conservés à l'obscurité. Le 24 décembre (après 6-8 jours), on passe la glycérine à travers trois mousselines et on l'inocule à la dose de 12 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un lapin. Le 4 janvier (11^e jour) celui-ci présente un commencement de paralysie du train postérieur. La maladie s'accroît le lendemain. Le soir, l'animal est déjà couché sur le côté. Mort le 6 janvier (13^e jour). Le bulbe est inoculé par trépanation à un autre lapin qui présente, le 14 janvier (8^e jour), les symptômes d'une rage très caractéristique à laquelle il succombe le 17 (11^e jour).

Obs. XI. — Du 19 au 22 décembre, 6 cerveaux de cobaye morts de rage des rues sont mis en glycérine et conservés à l'obscurité, à la température ambiante. Le 25 décembre, après 3 à 6 jours, on passe cette glycérine à travers un papier buvard gris et on l'inocule à la dose de 10 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un lapin. Celui-ci présente, le 9 janvier (15^e jour), une paralysie très marquée des muscles de la nuque. La tête n'étant plus soutenue vient toucher le sol de la cage. Le lendemain, la paralysie s'est généralisée et l'existence de la rage ne fait aucun doute. Mort dans la journée du 11 (17^e jour). Un lapin est inoculé sous la dure-mère avec le bulbe. Il est pris le 18 et succombe le 19 (8^e jour) à une rage très caractéristique.

Obs. XII. — Plusieurs cerveaux (5 ou 6) de lapins et de cobayes rabiques (virus fixe et virus de rue) sont immergés dans une première glycérine. Après 2-3 jours, celle-ci est rejetée et remplacée par une autre. Dans cette nouvelle glycérine, les cerveaux sont conservés une semaine; après quoi, on passe à travers trois mousselines et on inocule à raison de 10 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un lapin (29 décembre). Le 10 janvier (12^e jour), l'animal présente une paralysie très marquée et très caractéristique des muscles de la nuque. Le lendemain, les symptômes de la rage paralytique sont au complet. Mort le 12 au matin (14^e jour). Le bulbe est inoculé à un lapin qui, pris le 19 janvier (7^e jour), succombe 3 jours plus tard à une rage tout à fait caractéristique.

Obs. XIII. — Du 19 au 22 janvier, 7 cerveaux de cobaye ayant succombé au virus de rue sont mis en glycérine et conservés à l'obscurité. Le 27, après 5-8 jours par conséquent, cette glycérine est passée à travers un filtre de papier gris et inoculée à la dose de 10 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un lapin, à la dose de 5 cent. cubes dans les muscles de la nuque de deux cobayes. Le 6 février (10^e jour), le lapin commence à présenter de la paralysie des muscles de la nuque. Celle-ci est très marquée le lendemain. La tête n'étant plus soutenue vient toucher le sol de la cage. Le 8 février, la paralysie s'est généralisée aux quatre membres. Le lapin ne tarde pas à se coucher sur le côté et à entrer en agonie. Mort dans la soirée (12^e jour). Le bulbe est inoculé par trépanation à un autre lapin qui, pris le 8^e jour, succombe le surlendemain à une rage paralytique très caractéristique. Les deux cobayes sont demeurés en bonne santé.

En possession de ces résultats, nous nous sommes demandé si, grâce à cette diffusion du virus dans la glycérine, il ne serait pas possible de faire passer celui-ci d'un cerveau rabique à un cerveau sain. Dans ces conditions, à l'abri de la putréfaction, ce passage se réalise parfois très facilement, comme le prouvent les expériences qui suivent.

Nous devons noter cependant que la réussite de l'expérience n'est pas fatale et que nous n'avons pu encore déterminer tous les facteurs du succès. Nous avons obtenu un résultat positif dans le tiers des cas environ.

Obs. XIV. — Du 8 au 12 février, on immerge dans un flacon pot-ban renfermant de la glycérine neutre deux cerveaux de lapin et trois cerveaux de cobaye, ces divers animaux étant morts de rage à virus de rue. Le 13, on enlève le cerveau et la moelle cervicale d'un lapin neuf et, au moyen d'un fil stérilisé, on les suspend dans la même glycérine au milieu des cerveaux rabiques. Le flacon est conservé dans la chambre de dessiccation des moelles (obscurité, température 12 à 15°); puis, les 18, 19, 21, 23, 25, 27 février, c'est-à-dire après 5, 6, 8, 10, 12, 14 jours de contact entre le cerveau rabique et le cerveau sain, on prélève de celui-ci une partie superficielle (18-19 février) peu ou moyennement profonde (21, 23, 25 février), centrale (27 février); on émulsionne dans un peu d'eau physiologique et on inocule

sous la dure-mère d'un lapin. Le 27 février, la glycérine elle-même est passée à travers un papier gris et inoculée à la dose de 5 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un jeune lapin, à la dose de 10 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un lapin adulte. Les résultats obtenus ont été les suivants :

1^o Lapin inoculé le 18. Début de rage le 28 (10^e jour). Mort le 2 mars (12^e jour).

2^o Lapin inoculé le 19. Début de rage le 3 mars (12^e jour). Mort le 5 (14^e jour).

3^o Lapin inoculé le 21. Début de rage le 4 mars (11^e jour). Mort le 7 (14^e jour).

4^o Lapin inoculé le 23. Début de rage le 6 mars (11^e jour). Mort le 8 (13^e jour).

5^o Lapin inoculé le 25. Début de rage le 8 mars (11^e jour). Mort le 10 (13^e jour).

Le lapin inoculé le 27 avec la partie centrale du cerveau et les deux animaux inoculés le même jour avec la glycérine n'ont présenté aucun symptôme morbide.

Obs. XV. — Le 6 avril 1917, on immerge, dans la glycérine d'un petit flacon pot-ban, deux cerveaux et deux moelles de lapin ayant succombé au virus de rue. Le lendemain, on suspend dans le même flacon un cerveau de lapin neuf et le tout est laissé à la température et à la lumière du laboratoire. Les 11, 13, 15, 17, 19, 22 avril, soit après 5, 7, 9, 10, 11, 14 jours, on prélève de ce cerveau des parties superficielles (11, 13, 15, 17 avril), moyennement profondes (19 avril), centrales (22 avril); on les émulsionne dans de l'eau stérilisée et on les inocule sous la dure-mère du lapin ou du cobaye. Les résultats obtenus ont été les suivants :

Les animaux inoculés les 11 et 13 avril n'ont présenté aucun symptôme morbide.

Le 15 avril (8 jours de contact), un lapin et un cobaye sont inoculés avec une partie superficielle du cerveau du lapin neuf. Le cobaye n'a présenté aucun symptôme morbide. Le lapin est demeuré parfaitement bien portant jusqu'au 24 mai (39^e jour). A cette date, il attire l'attention le matin par de l'inappétence et une légère dyspnée. Comme nous voulons le prendre à la main, ce simple contact déclenche une crise de convulsions vraiment extraordinaire. L'animal recourbé en opisthotonos se détend brusquement à la façon d'un ressort et avec une violence telle qu'il est projeté hors de la cage. Il se tend à nouveau et se détend plusieurs fois de suite, faisant des bonds de plus de 50 centimètres de hauteur. Finalement, épuisé, il retombe sur le côté, en proie à une vive dyspnée. Après quelques minutes, celle-ci s'atténue; l'animal se remet d'aplomb et — à une légère accélération de la respiration près — reprend toutes les apparences de la santé; mais chaque fois qu'on vient à le toucher, les crises se reproduisent. Le lendemain, 25 avril (30^e jour), l'état paraît de tous points semblable. L'animal se tient tranquillement dans un coin de sa cage. Le fait de le prendre par les oreilles provoque, comme la veille, une crise de convulsions folle au cours de laquelle il se tend et se détend, bondit et rebondit, se remettant ensuite d'aplomb comme si de rien n'était. Inappétence et dyspnée légère dans l'intervalle des crises. Le soir, on le trouve couché en opisthotonos, le regard anxieux. On ne provoque plus qu'une ébauche de convulsions si on le prend à la main. Le 26 mai au matin (31^e jour), on le retrouve à peu près dans le

même état. En le touchant, on ne provoque plus de crises convulsives, mais une explosion de cris déchirants. Le soir, la respiration paraît vouloir s'éteindre. L'animal est sacrifié et on procède à l'autopsie qui, si l'on en excepte une vive congestion des méninges, ne montre absolument aucune lésion. Un lapin est inoculé sous la dure-mère avec le bulbe. Le 4 juin, au 9^e jour, il présente les premiers symptômes d'une rage paralytique qui, typique le lendemain, évolue d'une façon absolument classique et amène la mort le 7 juin, au 12^e jour.

Le 17 avril (10 jours de contact), un lapin et un cobaye sont inoculés de même avec une partie, superficielle encore, du cerveau du lapin neuf. Le 30 avril (13^e jour), le lapin présente les premiers symptômes d'une rage paralytique qui évolue de façon classique. Mort le 4 mai (17^e jour). Dès le 27 avril (10^e jour), le cobaye avait présenté une paralysie du train postérieur, qui s'était accentuée le lendemain, s'était étendue aux membres antérieurs et avait entraîné la mort le 29 avril, au 12^e jour. Deux passages avaient, pour plus de sûreté, été pratiqués, et un lapin et un cobaye avaient succombé à une rage caractéristique dans les délais habituels.

Le 19 avril, après 12 jours de contact par conséquent, un lapin est trépané avec la partie moyenne du cerveau neuf. Le 1^{er} mai (12^e jour), début d'une rage paralytique, qui évolue classiquement et amène la mort le surlendemain, au 14^e jour.

Un lapin et un cobaye, trépanés le 22 avril, avec une partie — profonde cette fois — du même cerveau, sont demeurés vivants et bien portants.

Il résulte de l'expérience précédente que l'obscurité n'est nullement indispensable au passage du virus d'un cerveau rabique à un cerveau sain. La suivante est de nature à montrer que la diffusion s'effectue aussi bien autour du cerveau de chien qu'autour des cerveaux de lapin ou de cobaye.

OBS. XVI. — Le 7 février 1917, le cerveau d'un chien mort d'une rage furieuse typique est débité en tranches et immergé dans un flacon de glycérine. Le lendemain, on suspend dans le même flacon le cerveau d'un lapin neuf. Le tout est conservé à l'obscurité dans la chambre de dessiccation des moelles (12-15°). Le 10 février — après 2 jours de contact par conséquent — le cerveau du lapin est retiré du flacon et lavé dans l'eau physiologique. Une partie superficielle est prélevée, émulsionnée et inoculée sous la dure-mère d'un lapin, après quoi le cerveau est remis en glycérine au contact du cerveau rabique. Même expérience les 12 et 14 février (4 et 6 jours de contact), avec des parties du cerveau de lapin graduellement plus profondes. Le 14 février, la glycérine elle-même est passée à travers un papier gris et inoculée, à la dose de 10 cent. cubes, dans les muscles de la nuque d'un lapin, à la dose de 5 cent. cubes dans les muscles de la nuque d'un cobaye.

Le lapin trépané le 10 février avec une partie superficielle du cerveau a présenté le 7 mars (25^e jour) de la tristesse, de l'inappétence et un commencement de paralysie. Celle-ci était complète le lendemain matin. La mort s'est produite le soir. Un lapin inoculé avec son bulbe a succombé le 20 mars (12^e jour) à une rage paralytique classique. Un 2^e passage, effectué pour plus de sûreté, a amené, le 1^{er} avril (12^e jour également), la mort au milieu

de symptômes qui, comme les précédents du reste, ne laissaient aucun doute sur la nature de la maladie ayant causé le décès.

Les lapins inoculés les 12 et 14 février avec des parties moyennement profonde ou centrale du cerveau n'ont présenté aucun symptôme morbide.

Le lapin et le cobaye inoculés ce même 14 février avec la glycérine ont présenté le premier le 20 mars (34^e jour), le second le 8 mars (22^e jour), les premiers symptômes d'une rage soit paralytique (lapin), soit mi-paralytique, mi-furieuse (cobaye), tout à fait caractéristiques, à laquelle ils n'ont pas tardé à succomber. Le diagnostic de rage a été, chaque fois, confirmé par les passages.

Le passage du virus rabique dans le cerveau du lapin étant bien établi, nous nous sommes demandé si, résultant non d'une culture, mais d'une diffusion, un passage analogue ne pourrait pas s'observer dans le cerveau d'un animal réfractaire à la rage, tel que la poule ou la tortue. Les expériences suivantes répondent à cette question.

Obs. XVII. — Du 16 au 22 mars, quatre cerveaux de lapin (2 virus fixes et 2 virus de rue) sont immergés dans la glycérine d'un petit flacon pot-ban. Le 22, on suspend dans cette même glycérine l'encéphale d'une poule et celui d'une tortue neuves. Le 26 et le 29, quatre et sept jours après le début du contact, ces deux cerveaux sont lavés à l'eau physiologique, et il est prélevé de chacun d'eux un fragment, superficiel la première fois, plus profond la seconde, qui est inoculé sous la dure-mère du lapin. Les résultats obtenus ont été les suivants :

Cerveau de poule. — Le 26 mars (4^e jour du contact), deux lapins ont été inoculés sous la dure-mère. L'un et l'autre ont présenté, le 4 avril (9^e jour), les symptômes d'une rage paralytique typique, qui a évolué normalement et a entraîné la mort le 6 avril, au 11^e jour.

Le 29 mars (7^e jour du contact), un seul lapin est inoculé sous la dure-mère. Début d'une rage paralytique classique le 9 avril, au 11^e jour. Mort le 11 avril, au 13^e. Le bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un autre lapin. Début de la rage paralytique le 20 avril, au 9^e jour. Mort le 24, au 13^e.

Cerveau de tortue. — Le 26 mars (4^e jour du contact), un lapin est inoculé avec une émulsion d'une partie superficielle du cerveau, soigneusement lavée au préalable. L'animal se porte bien pendant 31 jours. Le 27 avril au matin, il est trouvé couché sur le côté, dyspnéique et complètement paralysé. Il meurt le lendemain. Son bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un cobaye qui succombe le 8^e jour à une rage très caractéristique.

Le 29 mars (7^e jour du contact), deux lapins ont été inoculés semblablement avec une partie plus profonde du même cerveau de tortue. Ils n'ont présenté aucun symptôme morbide.

Obs. XVIII. — Du 25 au 30 avril 1917, 8 cerveaux de cobaye ayant succombé au virus de rue sont immergés dans la glycérine d'un petit flacon pot-ban. Le 30, on suspend au milieu d'eux l'encéphale d'une poule neuve. Le 7 mai — 7 jours plus tard — une partie superficielle de ce cerveau est prélevée aseptiquement, lavée à l'eau physiologique, émulsionnée et inoculée sous la

dure-mère d'un lapin. Le 18 mai (14^e jour), l'animal présente les premiers symptômes d'une rage paralytique à laquelle il succombe le 21 (14^e jour).

Le 10 et le 15 mai, des lapins ont été inoculés semblablement avec des parties plus profondes de ce même cerveau de poule. Ils sont demeurés vivants et bien portants.

Le passage du virus rabique d'un cerveau malade à un cerveau sain n'est donc pas une culture, mais une simple diffusion. Il s'effectue dans le cerveau d'un animal réfractaire à la rage aussi bien que dans celui d'un animal réceptif. Il était dès lors indiqué de rechercher si ce même passage n'était pas susceptible de s'effectuer dans un tissu autre que le tissu nerveux, le foie, la rate, le rein, par exemple. De fait, il a pu être mis en évidence dans les expériences suivantes :

OBS. XIX. — Trois cerveaux de lapins, morts du virus fixe, sont immergés le 10 mars dans la glycérine d'un petit flacon pot-ban et conservés à l'obscurité et à la température ambiante. Le 12 mars, on immerge à leur contact dans la même glycérine le rein d'un cobaye neuf. Le 19, c'est-à-dire 7 jours après le début du contact, le rein est prélevé et lavé à l'eau physiologique. Une partie de sa substance corticale est émulsionnée et inoculée sous la dure-mère d'un jeune lapin. Le 28 mars (9^e jour) cet animal présente les premiers symptômes d'une rage paralytique à laquelle il succombe le lendemain. Son bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin adulte qui, déjà suspect le 4 avril au 6^e jour (tristesse, inappétence), présente le lendemain les signes d'une rage paralytique tout à fait typique qui amène la mort du 7 au 9^e jour.

OBS. XX. — Du 2 au 6 avril, trois cerveaux de lapins et trois cerveaux de cobayes morts du virus de rue sont immergés dans la glycérine d'un petit flacon pot-ban. Le lendemain, on immerge à leur contact un des lobes du foie d'un lapin neuf et le tout est conservé à l'obscurité et à la température de la chambre. Les 12, 14, 16 avril, c'est-à-dire après 5, 7, 9 jours de contact, une petite portion de ce foie est prélevée, émulsionnée et inoculée chaque fois sous la dure-mère d'un lapin. Les animaux sont demeurés vivants et bien portants. Le 19 avril (12 jours de contact) un dernier lapin est inoculé avec le même foie, soigneusement rincé au préalable dans l'eau physiologique. Le 10 mai au matin (21^e jour), l'animal paraît très suspect. Il est triste, ne mange pas et a de l'incertitude de la démarche. Le lendemain, la rage paralytique est typique. Mort le 12 (23^e jour). Un lapin et un cobaye sont inoculés avec son bulbe. Ils succombent à la rage respectivement au 14^e jour (lapin) et au 12^e (cobaye).

II

DIFFUSIBILITÉ DU VIRUS RABIQUE DANS L'ORGANISME

Le virus rabique est donc susceptible de diffuser dans l'eau ou la glycérine qui baignent un cerveau de chien mort du virus de rue ou un cerveau de lapin ayant succombé au virus fixe. Consécutivement, il est susceptible d'imprégner un cerveau neuf, un rein ou un foie immergés dans le même liquide. Un phénomène analogue de diffusion peut-il se produire dans l'organisme? On conçoit l'importance de cette question. Un grand nombre d'auteurs ont signalé tour à tour la présence du virus rabique dans le liquide céphalo-rachidien, les milieux de l'œil, les capsules surrénales, le pancréas, etc. La plupart de ces recherches ont été entreprises un temps plus ou moins long après la mort. Elles perdent toute signification si le virus peut se diffuser dans l'organisme en partant du système nerveux central ou périphérique. Nous avons pensé résoudre ce problème en essayant de déterminer :

1° Si le virus rabique est susceptible de se rencontrer tardivement, lorsque commence la putréfaction, dans un organe où on ne le trouve ni pendant la vie, ni pendant les premières heures qui suivent la mort;

2° Si, étant donné un organe où la présence du virus rabique est inconstante, la fréquence de sa constatation diffère suivant que le prélèvement de l'organe est effectué avant ou après la mort de l'animal.

a) Le virus rabique ne se rencontre ni dans l'ovaire, ni dans le testicule ou le contenu des vésicules séminales du cobaye rabique. Nous nous en sommes assuré personnellement. Le liquide des vésicules séminales de quinze cobayes rabiques, les testicules de six autres, les ovaires de six autres encore ont été émulsionnés finement dans de l'eau physiologique; les émulsions ont été inoculées sous la dure-mère du lapin ou du cobaye; le surplus, s'élevant parfois jusqu'à 10 et 15 centi-

mètres cubes, était injecté dans les muscles de la nuque du même sujet. Aucun des animaux inoculés (21 lapins, 27 cobayes) n'a contracté la rage. Une deuxième série de recherches a été effectuée dans des conditions analogues, à cette différence près que les cadavres des animaux morts de rage étaient maintenus de 24 à 48 heures à la température de laboratoire avant qu'il fût procédé à l'ablation et à l'inoculation des vésicules, des testicules et des ovaires. Les émulsions étaient, par crainte de méningite septique, exclusivement injectées dans les muscles de la nuque; mais, pour contre-balancer la sévérité moins grande de ce mode d'inoculation, il était injecté chaque fois, du produit supposé virulent, une quantité double de celle inoculée dans la série précédente. L'injection comprenait ainsi deux testicules (au lieu d'un seul); quatre ovaires (au lieu de deux) et le contenu des vésicules de deux cobayes (au lieu d'un seul). Aucun des animaux inoculés (12 lapins, 24 cobayes) n'a contracté la rage. Le virus rabique n'envahit donc pas *post mortem* le testicule et l'ovaire du cobaye. Il est cependant inexact de dire que, pendant les dernières heures de la vie, le virus ne se trouve pas dans ces organes. Il existe vraisemblablement — comme dans tout le système nerveux périphérique — dans les filets nerveux qui les innervent, mais il s'y trouve en quantité trop faible pour pouvoir être mis en évidence au moyen des inoculations même les plus sensibles et, pas plus pendant la période agonique que pendant les 48 heures qui suivent la mort, il ne diffuse de filets nerveux dans les parenchymes glandulaires en quantité suffisante pour pouvoir être décelé.

b) Nos recherches ont porté tout d'abord sur la rate. Douze cobayes rabiques sont sacrifiés quelques heures avant la mort et leur rate entière, émulsionnée dans de l'eau physiologique, est injectée à la dose maxima compatible avec ce mode d'inoculation ($1/4$ à $1/2$ centimètre cube) sous la dure-mère d'un cobaye; ce pendant que le surplus de l'émulsion est inoculé en totalité dans les muscles de la nuque du même sujet. Trois cobayes ont pris la rage; 9 ont résisté. Douze autres cobayes ont été inoculés semblablement avec des rates prélevées de 1 à 12 heures après la mort naturelle de l'animal. Les résultats obtenus ont été identiques. Trois fois sur douze

les animaux ont pris la rage. Dans une troisième série d'expériences, 12 cobayes ayant succombé à la rage des rues sont laissés de 24 à 48 heures à la température du laboratoire. A ce moment seulement, la rate est prélevée, émulsionnée et inoculée dans les muscles de la nuque. Un seul animal a contracté la rage. La proportion plus considérable des résultats négatifs étant certainement due à la sévérité moins grande du mode d'inoculation, nous avons, dans une quatrième série de recherches, inoculé dans les muscles de la nuque d'un même cobaye, deux et trois rates rabiques. Simultanément, le laps de temps pendant lequel les cadavres étaient abandonnés avant d'être ouverts était porté à 2 et à 3 jours. Sur six cobayes inoculés un seul a pris la rage. Il semblerait donc de prime abord qu'au lieu de favoriser la diffusion du virus rabique, un commencement de putréfaction rendit sa constatation moins fréquente. Il n'y a là, croyons-nous, qu'une simple apparence due à la sévérité moindre et insuffisamment compensée de l'inoculation intramusculaire. Nous nous sommes, dans une dernière série de recherches qui a porté sur les capsules surrénales, soigneusement tenu à l'abri de cette cause d'erreur. Les capsules surrénales de seize cobayes rabiques prématurément sacrifiés ont été broyées, émulsionnées et inoculées dans les muscles de la nuque de 16 cobayes. 7 (44 p. 100) ont pris la rage; 9 ont survécu. Seize autres cobayes ont été inoculés semblablement avec les capsules de 16 cobayes morts de rage, puis conservés de 24 à 48 heures à la température du laboratoire avant d'être autopsiés. 11 (68 p. 100) ont pris la rage, 5 ont survécu. Il semble donc que la diffusion du virus rabique soit possible dans l'organisme, mais qu'elle soit exceptionnelle. Elle paraît moins fréquente que celle qui s'effectue *in vitro* dans l'eau physiologique, le sérum de Locke ou la glycérine. Peut-être un liquide se prête-t-il mieux qu'un organe solide à une « diffusion », assez voisine en somme d'une simple « dissolution ». Peut-être aussi la boîte crânienne et le canal rachidien forment-ils obstacle à cette diffusion et les nerfs périphériques renferment-ils trop peu de virus pour que son passage dans les parenchymes puisse être décelé par l'expérimentation. Toujours est-il que les expériences entreprises sur la présence du virus dans tel ou tel organe sans tenir compte

de la possibilité de la diffusion *post mortem* paraissent grevées d'une cause d'erreur bien peu importante et négligeable pratiquement.

*
* *

Cette propriété de diffuser *in vitro* dans certains liquides ou certains organes est-elle susceptible d'apporter quelque éclaircissement à la question toujours controversée de la nature intime du virus rabique? L'absence de corpuscules de Negri dans les cerveaux sains devenus rabigènes au contact de cerveaux rabiques et naturellement aussi dans le foie, le rein, la glycérine, l'eau physiologique où le virus a diffusé, n'est nullement en faveur du rôle pathogène de ces corpuscules. Elle constitue au contraire un argument très important en faveur de l'opinion qui voit dans ces éléments un simple processus de défense contre l'organisme ultra-microscopique de la rage ou contre sa toxine. D'autre part, la glycérine jouit à l'égard d'un certain nombre de microbes, à l'égard des bacilles du charbon, de la tuberculose et de la morve en particulier, d'un pouvoir conservateur analogue à celui qu'elle possède vis-à-vis du virus rabique. Cependant, si on immerge dans de la glycérine des rates charbonneuses, tuberculeuses, morveuses, l'agent pathogène ne diffuse pas dans le liquide qui peut, sans danger, être inoculé à un animal réceptif. A plus forte raison ne passe-t-il pas dans une rate neuve immergée dans cette glycérine. Nous avons vu qu'il en allait tout autrement avec le virus rabique. N'y a-t-il pas là quelque chose de spécial qui rapproche le virus de la rage des substances chimiques susceptibles, elles aussi, de diffuser dans les liquides?

Si le virus rabique se rapproche des microbes visibles par la propriété capitale de reproduire la maladie en série, il s'écarte d'eux et se rapproche au contraire des substances chimiques par son pouvoir de traverser les bougies filtrantes. Cependant, une substance chimique en solution dans un liquide traverse les bougies quel que soit le degré de leur resserrement, tandis que le virus rabique ne traverse que des bougies d'une porosité déterminée. Si l'on emploie des bougies moins

perméables, les animaux succombent avec tous les symptômes de la rage, mais sans que la maladie puisse être reproduite en série. Avec des bougies plus serrées encore, les animaux demeurent bien portants ou bien on observe des symptômes (amaigrissement, cachexie) n'ayant avec la rage que des rapports très éloignés et tels que sont susceptibles d'en provoquer (A. Marie) des filtrats de substance nerveuse normale. Le virus rabique se comporte donc à l'égard de la filtration d'une façon différente à la fois des micro-organismes et des substances chimiques. Une différence analogue s'observe dans la façon dont il se comporte à l'égard de la centrifugation. Alors qu'une substance chimique en solution dans un liquide n'est pas influencée par la force centrifuge, il se laisse influencer par elle, mais seulement dans des proportions minimales. Il abandonne les couches superficielles du liquide, mais il ne les abandonne que très lentement, beaucoup plus lentement que ne le ferait dans une culture en bouillon ou dans une émulsion le plus fin des microbes visibles.

Le virus rabique possède en somme un ensemble de propriétés dont la réunion tient du paradoxe. A la fois filtrable, diffusible et capable de se reproduire, il semble qu'on doive le considérer comme un intermédiaire entre les microbes visibles qui se trouvent à la limite inférieure du règne végétal et les diastases, c'est-à-dire des substances colloïdales qu'il n'est peut-être pas interdit de placer à la limite supérieure des corps inorganiques. Sans doute y a-t-il là une nouvelle application du vieil adage que la nature ne fait pas de sauts. On serait même tenté d'émettre l'hypothèse que le fait de forcer le virus rabique à passer à travers une bougie très serrée, à être en quelque sorte laminé entre ses mailles, suffit à produire dans sa constitution une modification telle que, sans lui enlever ses autres propriétés, elle lui fait perdre celle de reproduire la maladie, transformant en colloïde le fin organisme ultra-microscopique qu'est le microbe de la rage et réalisant en quelque sorte le passage entre deux règnes. La toxine rabique n'aurait pas ainsi une existence propre, indépendante de celle du microbe, comme c'est le cas dans la diphtérie ou le tétanos. Elle ferait si intimement partie de sa constitution qu'elle en

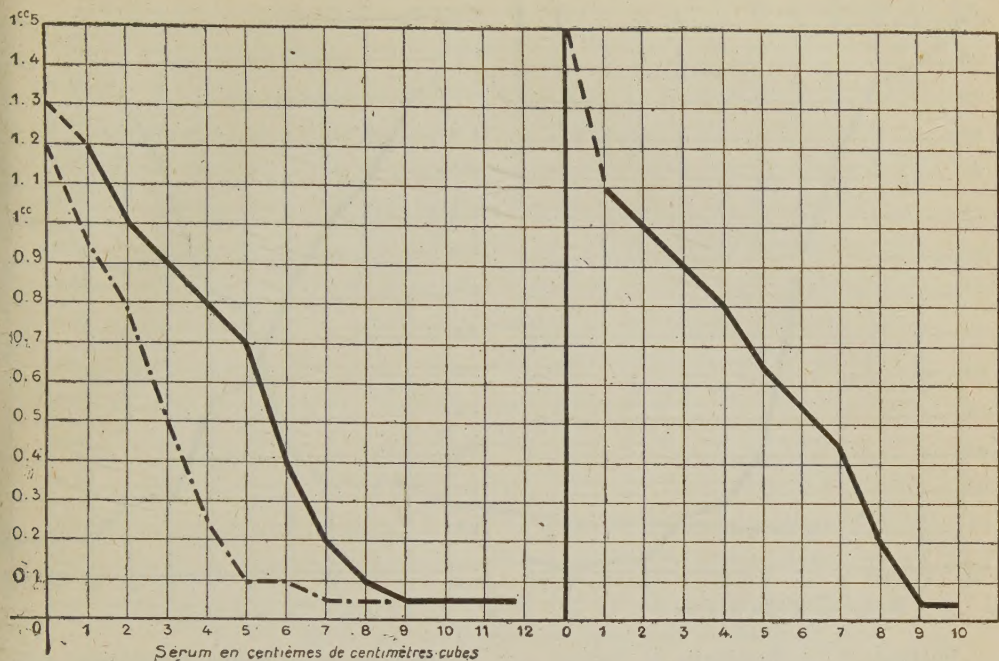
serait une sorte d'état allotropique dont certaines forces physiques pourraient amener la production. Quoi qu'il en soit de cette dernière hypothèse, un peu aventureuse, nous ferons remarquer que notre conception du virus rabique — forme de transition entre les microbes visibles et les colloïdes, diastases ou toxines — se rapproche dans une certaine mesure du *contagium vivum fluidum* invoqué par Beijerinck dans la genèse de la maladie du tabac connue sous le nom de « mosaïque ». Elle en diffère cependant. Un contage liquide vivant devrait passer à travers les bougies quel que fût leur degré de porosité et ne devrait pas être influencé par la centrifugation. Or, ainsi que nous l'avons vu, ces deux conditions ne sont pas remplies par le virus de la rage. Nous ajouterons enfin que ce que nous venons de dire du virus rabique s'applique vraisemblablement à d'autres micro-organismes dits invisibles ou ultra-microscopiques, à d'autres « virus filtrants ». S'il était démontré que ceux-ci peuvent également diffuser *in vitro* dans les liquides et les organes, on pourrait les considérer eux aussi comme ménageant le passage entre les bactéries et les diastases.

*
* *

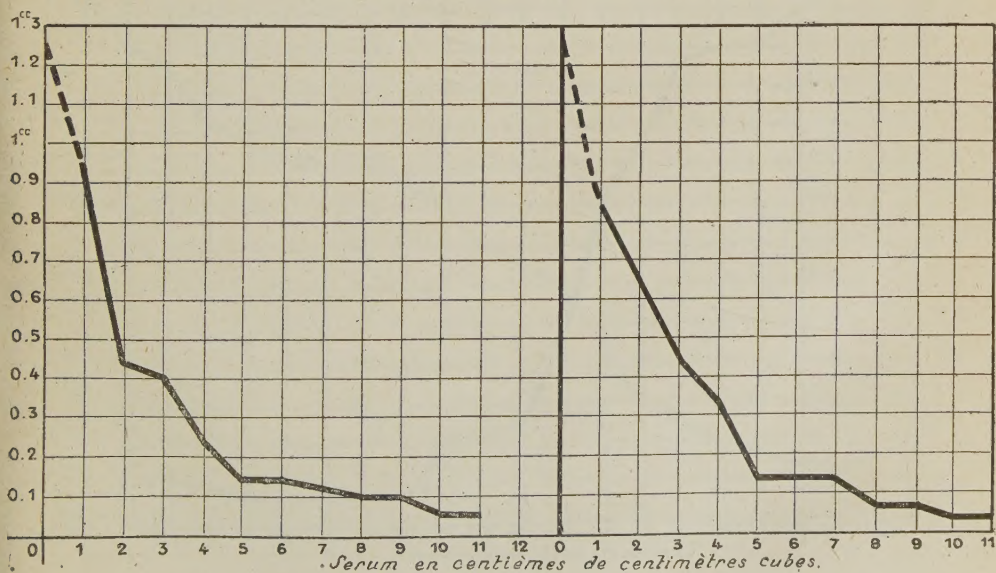
Nous demandons la permission de faire remarquer, en terminant, que nous ne nous dissimulons nullement ce que certaines des idées qui précèdent peuvent avoir de hasardé. Aussi ne les avançons-nous qu'à titre d'hypothèses. M. le Dr Roux, qui nous a fait le grand honneur de s'intéresser à nos expériences, nous a fait observer avec raison qu'elles étaient justiciables d'une interprétation fort différente de la nôtre : l'entraînement dans les liquides d'un organisme très fin venant se coller sur les corps suspendus dans le milieu. La glycérine, avide d'eau, provoque l'exsudation des liquides aqueux contenus dans le cerveau. Dans ce mouvement, des particules très ténues peuvent être mobilisées. Il y aurait ainsi *entraînement* des fins organismes rabiques et non *diffusion* à la manière d'une substance soluble. On peut supposer également que, dans nos expériences, il y a eu simplement répartition dans la glycérine, l'eau salée, le liquide de Locke de virus rabique très

ténu provenant de la surface de l'encéphale. Il est fatal, en effet, qu'il se produise quelques érosions superficielles au cours de l'ablation des cerveaux et la précaution que nous avons prise de laver ceux-ci plusieurs fois, avant de les immerger, n'est peut-être pas suffisante pour éviter, de ce fait, toute cause d'erreur.

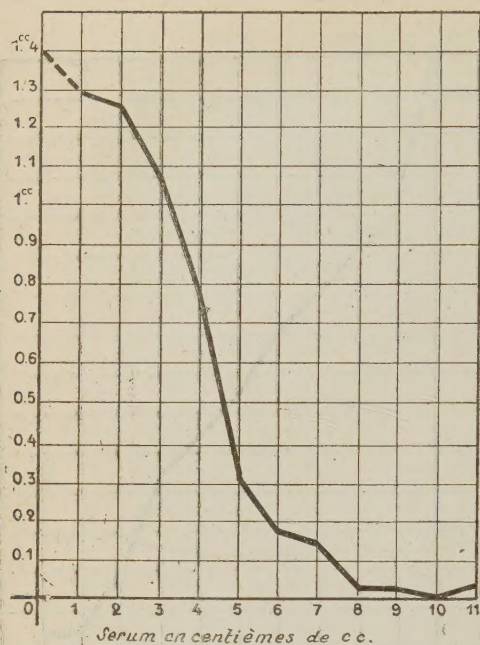
Le Gérant : G. MASSON.



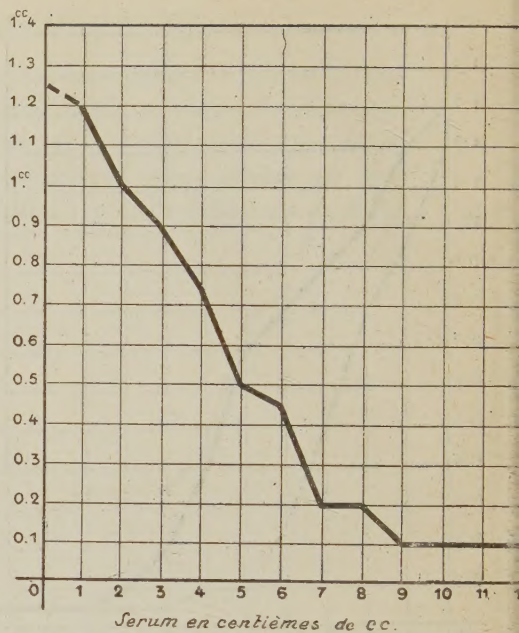
GRAPHIQUE 6-7. — Représentation graphique de l'action antitryptique de trois sérums humains, normaux (voir graphiques 16 et 17).



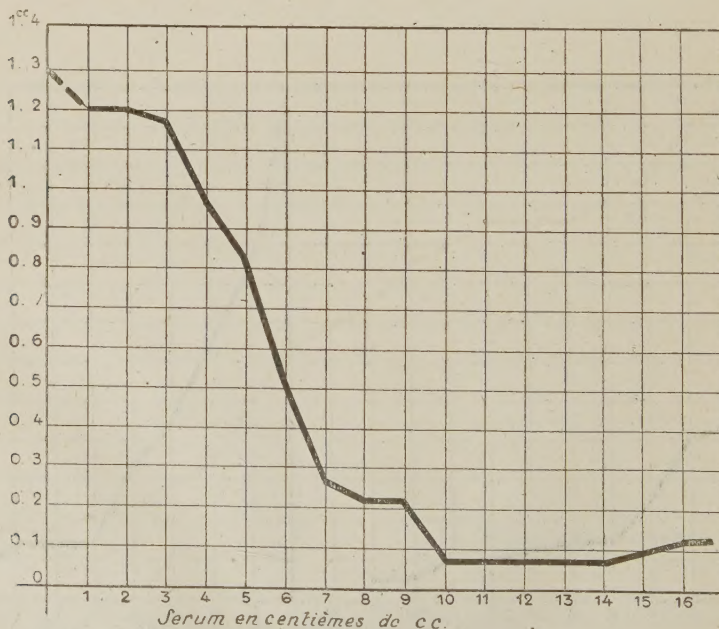
GRAPHIQUE 8. — Allure de l'action antitryptique de deux sérums de chevaux normaux.



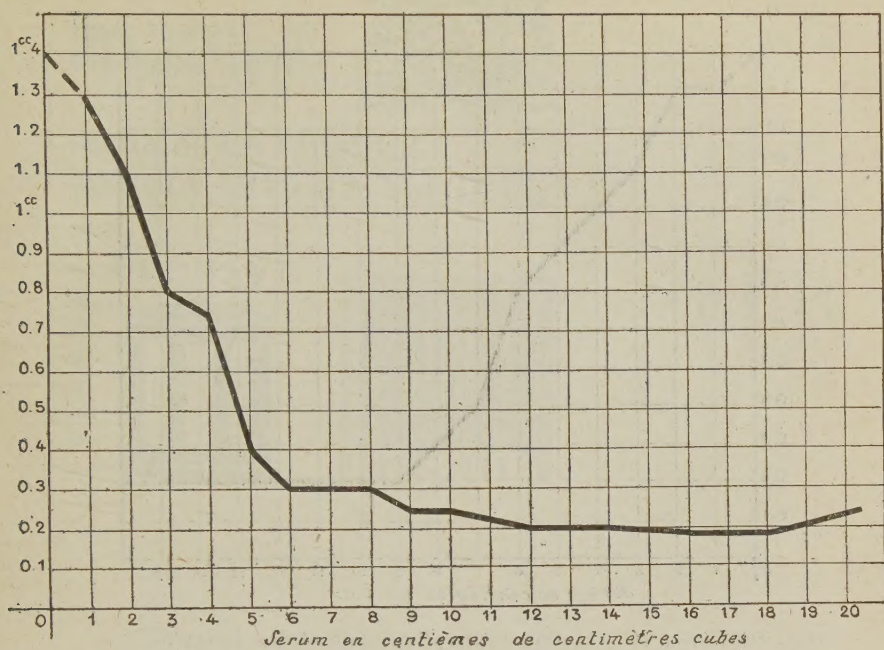
GRAPHIQUE 9. — Graphique de l'action antitryptique d'un sérum de *cobaye*.



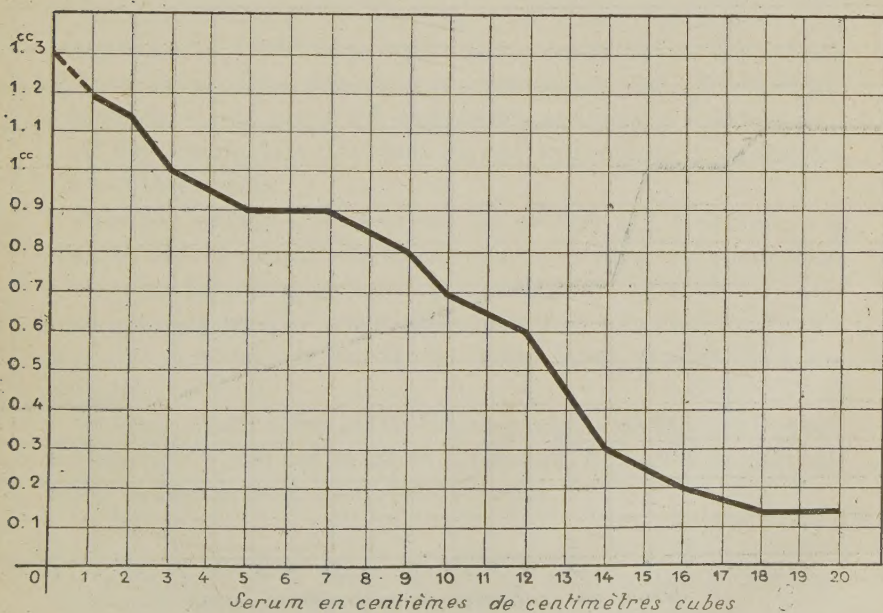
GRAPHIQUE 10. — Action antitryptique d'un sérum de *mouton*.



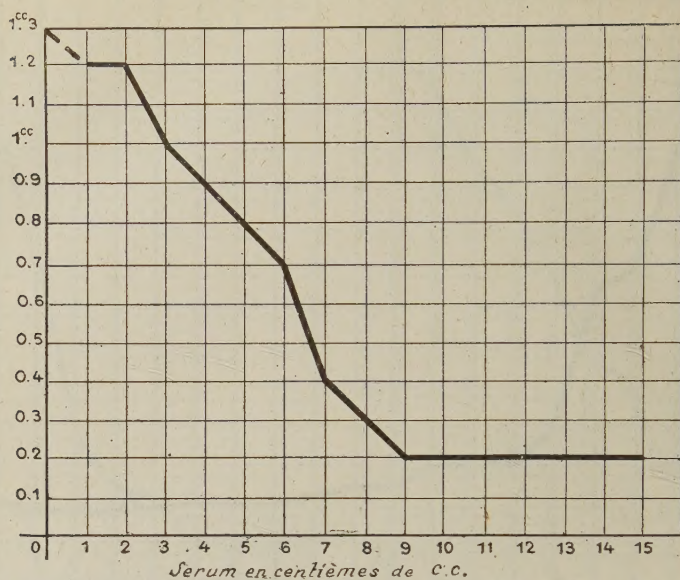
GRAPHIQUE 11. — Action antitryptique d'un sérum de *chien*.



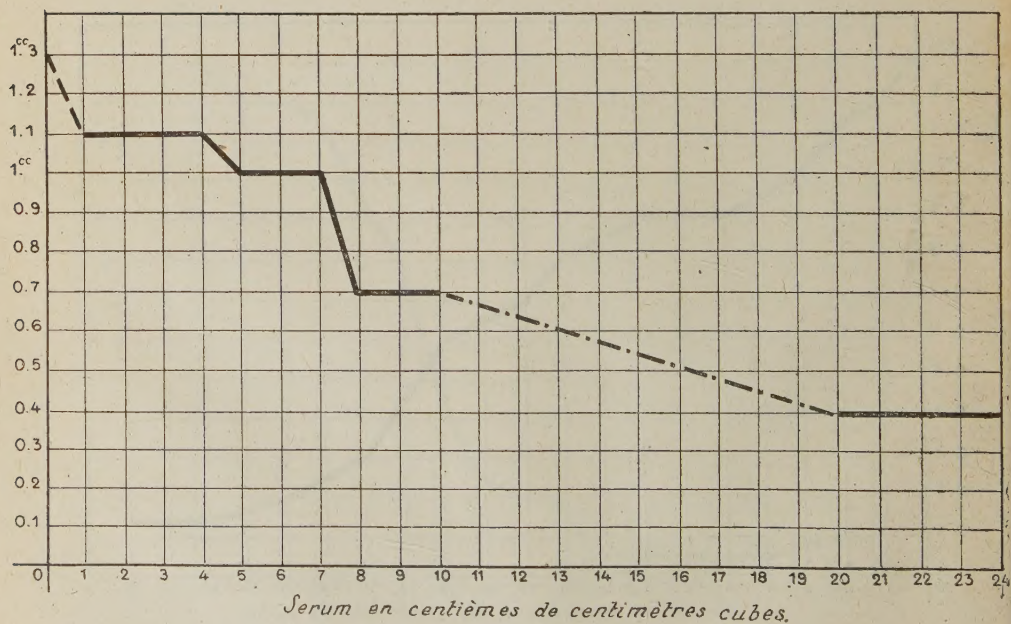
GRAPHIQUE 12. — Action antitryptique d'un sérum de lapin.



GRAPHIQUE 13. — Action antitryptique d'un sérum de lapin.



GRAPHIQUE 14. — Action antitryptique d'un sérum d'anguille.



GRAPHIQUE 15. — Action antitryptique d'un sérum de poule.